

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**



**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**Departamento de Química Analítica, Nutrición y**  
**Bromatología**

**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS  
AUTOMÁTICOS PARA LA DETERMINACIÓN  
DE METALES EN EL MEDIO AMBIENTE  
LABORAL**



**ROSA M<sup>a</sup> CESPÓN ROMERO**  
**Memoria para optar al grado de Doctora en Química**  
**Santiago de Compostela, Curso 2007-08**



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología**



**DESARROLLO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS AUTOMÁTICOS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE METALES EN EL  
MEDIO AMBIENTE LABORAL**



**ROSA M<sup>a</sup> CESPÓN ROMERO**

**Memoria para optar al grado de Doctora en Química  
Santiago de Compostela, Curso 2007-08**





M<sup>a</sup> del Carmen Yebra Biurrun, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela

AUTORIZA:

A la Licenciada Dña. Rosa M<sup>a</sup> Cespón Romero, la presentación de la memoria del trabajo titulado: "DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS AUTOMÁTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES EN EL MEDIO AMBIENTE LABORAL", que ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Química, para optar al grado de Doctora en Química.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Santiago de Compostela, diciembre de 2007.

La Doctoranda  
Rosa M<sup>a</sup> Cespón Romero



Manifiesto mi gratitud:

- ✓ Al departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología por permitirme realizar este trabajo.
- ✓ A mi directora de tesis, M<sup>a</sup> Carmen, por su confianza, orientación, ayuda, apoyo incondicional, paciencia infinita y dedicación constante. Sólo puedo decir que es una gran directora, pero que todavía es mejor persona y amiga. Tú me has enseñado a creer en mí.
- ✓ A Minuca por su amistad, apoyo y sus acertados consejos.
- ✓ A Amada por su interés y todos esos momentos que compartimos.
- ✓ A Chus por su amistad y ejemplo de trabajo, constancia y honestidad.
- ✓ A Alfonso por darme la oportunidad de incorporarme al mundo laboral y contagiarme su pasión por la "prevención".
- ✓ A Pilar por tantas conversaciones, por ayudarme a ver las cosas desde otro punto de vista y por sus variados y acertados consejos.
- ✓ A todos mis compañeros por estar ahí cada día ayudándome, animándome y haciendo que tantas horas de trabajo sean mucho más llevaderas.
- ✓ A mis amigas de "toda la vida" porque siempre están ahí.
- ✓ A Juan, Jaquelin y Javier porque con sus vidas han contribuido a demostrar que la "prevención" es necesaria.
- ✓ A Jorge y a Rita. Jamás podré olvidar el gesto que tuvisteis conmigo, y vosotros saber lo mucho que significó para mí.
- ✓ A todas aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a la realización de esta tesis y a las que han estado a mi lado durante todo este tiempo mostrándome su apoyo.
- ✓ A José Luis, por su protección desde que nací.
- ✓ Por último y por ello no menos importante, sino todo lo contrario, a mis padres, que para mí han sido los mejores y nunca habría llegado aquí sin su ayuda, protección, sacrificio, cariño y confianza. Gracias por apoyar siempre mis decisiones aunque no estuvierais de acuerdo.



*A mis padres y a Mari Carmen,  
Sin ellos, este sueño no hubiese sido realidad.*





## Índice





CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN .....	1
1.- HIGIENE INDUSTRIAL.....	3
2.- METALES EN EL MEDIOAMBIENTE LABORAL.....	5
2.1. Tratamiento y Acabado Superficial de Metales.....	5
2.2. Procesos de Fundición de Metales.....	6
2.3. Proceso de Soldadura.....	7
2.3.1.- Riesgos del proceso de soldadura.....	12
2.3.2. Sistemas de prevención del riesgo higiénico en las operaciones de soldadura.....	17
2.4. Evaluación del Riesgo Higiénico.....	21
3.- METALES: PROPIEDADES Y TOXICIDAD.....	30
3.1. Cadmio.....	30
3.2. Cinc.....	32
3.3. Cobalto.....	35
3.4. Cobre.....	36
3.5. Cromo.....	39
3.6. Hierro.....	42
3.7. Manganeseo.....	43
3.8. Níquel.....	45
3.9. Plomo.....	47
4.- INDICADORES BIOLÓGICOS DE LA EXPOSICIÓN A METALES .....	50
4.1. La Orina como Indicador de la Exposición.....	52
4.2. El Pelo como Indicador de la Exposición.....	53
4.3. La sangre como Indicador de la Exposición.....	54
4.4. Otros Medios.....	54
5.- DETERMINACIÓN DE METALES EN EL AIRE DEL LUGAR DE TRABAJO: HUMOS DE SOLDADURA..	55
5.1.- Toma de Muestra de Aire.....	55
5.2.- Preparación de la Muestra: Digestión del Filtro....	59
5.2.1. Tratamiento alternativo: Extracción asistida por energía de ultrasonidos.....	60
6.- DETERMINACIÓN DE METALES EN PELO.....	62

6.1.- Toma y Almacenamiento de la Muestra para la Determinación de Elementos Traza.....	62
6.2.- Lavado de la Muestra de Pelo.....	63
6.3.- Preparación de la Muestra de Pelo.....	64
6.3.1. Tratamiento alternativo: Extracción asistida por energía de ultrasonidos.....	65
7.- DETERMINACIÓN DE METALES EN ORINA.....	66
7.1.- Toma y Almacenamiento de la Muestra para la Determinación de Elementos Traza...	66
7.2.- Preparación de la Muestra de Orina.....	67
8.- DETECCIÓN DE LOS METALES EN AIRE, PELO Y ORINA.....	69
9.- ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA).....	70
9.1.- Acoplamiento FIA-Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA).....	72
10.- AUTOMATIZACIÓN EN LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS SÓLIDAS: MÉTODOS CONTINUOS UTILIZANDO ENERGÍA DE ULTRASONIDOS.....	75
11.- EL ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO APLICADO EN LA DETERMINACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE HIGIENE INDUSTRIAL.....	78
11.1. Muestras de Aire (Humos de Soldadura, Polvo, Materia Particulada y Aire del Medio Ambiente Laboral).....	81
11.2. Muestras de Pelo.....	83
11.3. Muestras de Orina.....	83
12.- TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO ANALÍTICO. DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	84
12.1.-Diseño Factorial.....	85
12.1.1.- Diseños factoriales de superficie de respuesta.....	86
12.1.2.- Diseños factoriales de Screening.....	87
CAPÍTULO II.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	89

CAPÍTULO III.- PARTE EXPERIMENTAL 1: Determinación de Metales en Humos de Soldadura .....	99
1.- MUESTREO DE LOS HUMOS DE SOLDADURA.....	101
1.1.- Descripción de Puesto de Trabajo Muestreado.....	101
1.2. Muestreo y Puntos de Muestreo.....	102
1.3. Aparatos de Toma de Muestra.....	103
2.- DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA CONTINUO DE LIXIVIACIÓN ASISTIDA POR ENERGÍA DE ULTRASONIDOS.....	104
2.1.- Aparatos, Instrumentación Analítica y Reactivos..	106
3.- OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA LIXIVIACIÓN DE LOS METALES CONTENIDOS EN EL FILTRO DE CAPTACIÓN DE AIRE EN EL SISTEMA FIA: DISEÑOS EXPERIMENTALES .....	108
3.1. Diseños de Screening.....	108
3.1.1. Conclusiones del diseño de screening (Plackett-Burman).....	124
3.2. Diseños de Superficie de Respuesta.....	136
3.2.1. Conclusiones del diseño de superficie de respuesta.....	145
4.- OPTIMIZACIÓN DE LOS RESTANTES PARÁMETROS DEL SISTEMA FIA.....	152
5.- MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES EN HUMOS DE SOLDADURA.....	154
5.1.- Aparatos, Instrumentación Analítica y Reactivos...	154
5.2.- Procedimiento para la Determinación de Metales en Humos de Soldadura.....	155
6.-CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES EN HUMOS DE SOLDADURA.....	159
6.1. Rectas de Calibrado.....	159
6.2.- Límites de Detección y Límites de Cuantificación..	163
6.3.- Sensibilidad del Método Analítico.....	166
6.4.-Intervalo Lineal.....	166
6.5.-Estudio de la Precisión del Método.....	169
6.6.- Estudio de la Exactitud del Método.....	170

6.6.1. Comparación con el método de referencia...	170
6.6.2.- Recuperación del método.....	173
6.7.- Recta de Adición.....	175
6.8.- Frecuencia de Muestreo.....	178
7.- APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN DE METALES EN HUMOS DE SOLDADURA.....	179
8.- EVALUACIÓN DEL RIESGO HIGIÉNICO.....	185
8.1.-Para Cada Metal.....	185
8.2.-Considerando Todos los Metales.....	186
 CAPÍTULO IV.- PARTE EXPERIMENTAL 2: Determinación de Cr(VI) en Humos de Soldadura .....	 187
1.- OPTIMIZACIÓN DE LA PRECONCENTRACIÓN ON-LINE DEL CR(VI): DISEÑOS EXPERIMENTALES .....	190
1.1. Diseño de Screening.....	191
1.1.1. Conclusiones del diseño de screening (Fracción 1/2).....	195
1.2. Diseño de Superficie de Respuesta.....	198
1.2.1. Conclusiones del diseño de superficie de respuesta.....	200
2.- OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA LIXIVIACIÓN DEL Cr(VI) CONTENIDO EN EL FILTRO DE CAPTACIÓN DE AIRE EN EL SISTEMA FIA: DISEÑOS EXPERIMENTALES .....	202
2.1. Diseño de Screening.....	203
2.1.1. Conclusiones del diseño de screening (Fracción 1/2).....	208
2.2. Diseño de Superficie de Respuesta.....	210
2.2.1. Conclusiones del diseño de superficie de respuesta.....	212
3.- DETERMINACIÓN DE Cr(VI) EN PRESENCIA DE Cr(III).....	214
4.- MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE Cr(VI) EN HUMOS DE SOLDADURA.....	215

4.1.- Aparatos, Instrumentación Analítica y Reactivos...	215
4.2.- Procedimiento para la Determinación de Cr(VI) en Humos de Soldadura.....	215
5.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE Cr(VI) EN HUMOS DE SOLDADURA.....	218
5.1. Recta de Calibrado: Cálculo del Factor de Preconcentración.....	218
5.2.- Límites de Detección y Límites de Cuantificación..	219
5.3.- Sensibilidad del Método Analítico.....	220
5.4.-Intervalo Lineal.....	220
5.5.-Estudio de la Precisión del Método.....	221
5.6.- Estudio de la Exactitud del Método.....	222
5.6.1. Comparación con el método de referencia...	222
5.6.2.- Recuperación del método.....	223
5.7.- Recta de Adición.....	224
5.8.- Frecuencia de Muestreo.....	224
6.- APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN DE Cr(VI) EN HUMOS DE SOLDADURA.....	225
 CAPÍTULO V.- PARTE EXPERIMENTAL 3: Determinación de Metales en Pelo .....	227
1.- MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE PELO.....	229
2.- DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA CONTINUO DE LIXIVIACIÓN ASISTIDA POR ENERGÍA DE ULTRASONIDOS.....	229
2.1.- Aparatos, Instrumentación Analítica y Reactivos..	230
3.- OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA LIXIVIACIÓN DE LOS METALES DE LA MUESTRA DE PELO EN EL SISTEMA FIA : DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	231
3.1. Diseños de Screening.....	231
3.1.1. Conclusiones del diseño de screening (Plackett-Burman).....	245
3.2. Diseños de Superficie de Respuesta.....	258

3.2.1. Conclusiones del diseño de superficie de respuesta.....	267
4.- OPTIMIZACIÓN DE LOS RESTANTES PARÁMETROS DEL SISTEMA FIA.....	274
5.- MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE PELO.....	275
5.1.- Aparatos, Instrumentación Analítica y Reactivos...	275
5.2.- Procedimiento para la Determinación de Metales en Muestras de Pelo.....	275
6.-CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE PELO.....	279
6.1.- Rectas de Calibrado.....	279
6.2.- Límites de Detección y Límites de Cuantificación..	279
6.3.- Sensibilidad del Método Analítico.....	281
6.4.- Intervalo Lineal.....	282
6.5.-Estudio de la Precisión del Método.....	283
6.6.- Estudio de la Exactitud del Método.....	284
6.6.1. Comparación con el método de referencia...	284
6.6.2.- Recuperación del método.....	286
6.6.3.- Medida de materiales de referencia.....	287
6.7.- Recta de Adición.....	289
6.8.- Frecuencia de Muestreo.....	291
7.- APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE PELO.....	292
 CAPÍTULO VI.- PARTE EXPERIMENTAL 4: Determinación de Metales en Orina.....	 227
1.- MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE ORINA.....	307
2.- OPTIMIZACIÓN DE LA PRECONCENTRACIÓN ON-LINE DE LOS METALES: DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	308
2.1.- Diseño de Screening.....	310
2.1.1. Conclusiones del diseño de screening	

(Plackett-Burman).....	323
2.2. Diseños de Superficie de Respuesta.....	335
2.2.1. Conclusiones del diseño de superficie de respuesta.....	347
3. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA DIGESTIÓN EN LÍNEA DE LA MUESTRA DE ORINA EN EL SISTEMA FIA: DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	359
3.1. Diseño Experimental: Superficie de respuesta.....	361
3.1.1.- Conclusiones del diseño de superficie de respuesta.....	368
4.- MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE CADMIO, COBALTO, CROMO, COBRE, HIERRO, MANGANESO, NÍQUEL Y PLOMO EN ORINA.....	374
4.1.- Aparatos, Instrumentación Analítica y Reactivos..	374
4.2.- Procedimiento para la determinación de cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel y plomo en orina.....	374
5.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE ORINA.....	377
5.1. Rectas de Calibrado.....	377
5.2.- Límites de Detección y Límites de Cuantificación...	381
5.3.- Sensibilidad del Método Analítico.....	381
5.4.-Intervalo Lineal.....	382
5.5.-Estudio de la Precisión del Método.....	382
5.6.- Estudio de la Exactitud del Método.....	384
5.6.1. Comparación con el método de referencia.	384
5.6.2.- Recuperación del método.....	385
5.7.- Recta de Adición.....	387
5.8.- Frecuencia de Muestreo.....	389
6.- APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE ORINA.....	390
7.- DETERMINACIÓN DE CINCO EN ORINA.....	396
7.1.- Optimización de las variables implicadas en	

el sistema FIA.....	397
7.2.- Método propuesto para la determinación de cinc en orina.....	398
7.2.1. Aparatos, instrumentación analítica y reactivos.....	398
7.2.2. Procedimiento para la determinación de cinc en orina.....	398
7.3.- Características analíticas del método propuesto para la determinación de cinc en muestras de orina.....	399
7.3.1. Recta de calibrado.....	399
7.3.2. Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	400
7.3.3. Sensibilidad del Método Analítico.....	400
7.3.4. Intervalo lineal.....	400
7.3.5. Estudio de la Precisión del Método.....	400
7.3.6. Estudio de la Exactitud del Método.....	401
7.3.7.- Recta de Adición.....	403
7.3.8.- Frecuencia de Muestreo.....	403
7.4.- Aplicación del Método Propuesto: Determinación de Zn en Muestras de Orina.....	404
 CAPÍTULO VII.- CONCLUSIONES .....	407
 BIBLIOGRAFÍA.....	413
 ANEXO I.- ÍNDICE DE TABLAS.....	439
 ANEXO II.- ÍNDICE DE FIGURAS.....	449
 ANEXO III.- PRODUCCIÓN CIENTÍFICA FRUTO DE ESTA MEMORIA.....	457





## **Capítulo I.- *Introducción***



## 1.- HIGIENE INDUSTRIAL

La Higiene Industrial con la seguridad, la ergonomía y la psicología aplicada es una de las disciplinas incluidas en el campo de la prevención de riesgos laborales [1]. La higiene industrial se define como una técnica no médica de prevención de las enfermedades profesionales, mediante el control en el medio ambiente de trabajo de los contaminantes que las producen. Por tanto, esta disciplina se ocupa de las relaciones y efectos que produce sobre el trabajador el contaminante existente en el lugar de trabajo. La higiene del trabajo se desarrolla a través de cuatro ramas fundamentales con el objeto de racionalizar el trabajo y para evaluar y corregir las condiciones medioambientales partiendo de criterios de validez general:

- La Higiene Teórica: Se responsabiliza del estudio de los contaminantes y su vínculo con el hombre por medio de estudios epidemiológicos y experimentación humana o animal. Esto se realiza con el fin de estudiar las relaciones dosis-respuesta o contaminante-tiempo para fijar unos valores estándar de concentración de sustancias en el ambiente y unos tiempos de exposición ante los que la generalidad de los trabajadores pueden estar reiteradamente expuestos dentro de su jornada laboral, sin que se generen efectos nocivos para su salud.
- La Higiene de Campo: Tiene por misión el estudio de la situación e investigación de los contaminantes y condiciones de trabajo, identificando los peligros para la salud, evaluando el grado de los riesgos higiénicos y sus posibles causas, para posteriormente adoptar las medidas necesarias de control. La herramienta de la higiene de campo es la *encuesta higiénica*, donde se descubren y analizan los diferentes factores que median en un problema higiénico, permitiendo la aplicación de medidas técnicas o medidas de control y la disminución de las situaciones de riesgo.
- La Higiene Analítica: La Higiene Analítica es la aplicación de la Química Analítica a la Higiene del Trabajo. Se encarga de procesar muestras y determinar en ellas cualitativa y/o cuantitativamente los contaminantes

químicos presentes en el medio ambiente laboral. Las funciones de la Higiene Analítica son las siguientes:

- a) Análisis de materias primas u otros productos que puedan ser focos de contaminación.
- b) Análisis de las sustancias químicas presentes en el medio ambiente laboral.
- c) Análisis de los contaminantes presentes en fluidos biológicos de personas expuestas a ellos.
- d) Investigación dirigida a obtener nuevos métodos analíticos, a mejorar los ya existentes, y a estudiar los efectos toxicológicos que puedan producir los contaminantes químicos sobre animales experimentales y/o tejidos biológicos.

- La Higiene Operativa: Actúa sobre los distintos factores que median en el proceso para lograr la eliminación del riesgo higiénico, o si no es posible para reducirlo hasta límites aceptables (no perjudiciales para la salud). El orden de actuación es el siguiente:

- 1.- Foco emisor del contaminante.
- 2.- Medio de difusión del contaminante
- 3.- Trabajadores expuestos

De todos los sistemas de control, los más eficaces desde el punto de vista de la Higiene del Trabajo son los que intervienen sobre el foco emisor del contaminante, ejercitándose sobre el medio difusor en los casos donde no ha sido posible la eliminación del foco. Por último, actúa sobre los trabajadores expuestos, siempre que no ha sido posible intervenir sobre las precedentes etapas, o como medida complementaria de otras medidas practicadas.

## 2.- METALES EN EL MEDIO AMBIENTE LABORAL

En los principales procesos y operaciones industriales, es frecuente encontrar numerosos casos de exposición de los trabajadores a metales en el medio ambiente laboral. A continuación, se expone una relación de los procesos industriales donde existe un mayor riesgo higiénico inherente para los trabajadores por la presencia de metales y/o sus compuestos.

### 2.1. Tratamiento y Acabado Superficial de Metales

Todos los metales tienen como característica fundamental su capacidad para oxidarse. Este factor está relacionado con el mayor o menor grado de deterioro que puedan sufrir los metales frente a un medio ambiente desfavorable que haga que se modifiquen sus propiedades funcionales. Los agentes exteriores (químicos, atmosféricos, etc.) atacan vivamente la superficie de los metales formando óxidos, hidróxidos, carbonatos, etc., los cuales, junto al metal y en un medio conductor, forman una pila en la que éste es el ánodo, mientras que la película de óxido forma el cátodo, y cuya acción es simplemente la descomposición del electrolito. Para evitar esta acción destructora de los metales se acude al tratamiento de la superficie metálica mediante la aplicación de una película de pintura o de otro metal. Tanto en un caso como en otro, lo que se busca es hacer a la vez mejor y más atractivo el producto fabricado para su posterior venta. La necesidad de realizar esta protección ha hecho evolucionar mucho las técnicas del tratamiento superficial, pero no ha ocurrido lo mismo con relación a la prevención de riesgos que estos tratamientos llevan consigo y que son elevados por la diversidad y peligrosidad de las sustancias empleadas. Antes del acabado final que supone el recubrimiento de la superficie metálica se lleva a cabo la preparación de la superficie que puede efectuarse mecánica y/o químicamente. Los riesgos higiénicos más importantes derivados de estas operaciones, en lo que a contaminantes químicos se refiere, son la posible inducción a la silicosis debida a la  $\text{SiO}_2$  que contienen todos los abrasivos y los potenciales efectos tóxicos producidos por algunos metales contenidos en ellos. Varias son las formas con que se pueden tratar las superficies metálicas, entre las que destacan: a) Recubrimiento electrolítico: este proceso se basa en

la deposición en el cátodo de un ión metálico, al ser introducida una pieza en una disolución que contiene un electrolito. Los riesgos higiénicos se derivan, en este caso, de la naturaleza del baño electrolítico utilizado. b) Recubrimiento por inmersión en baños de metal fundido: en este caso, se realiza mediante la inmersión de la pieza en el metal fundido, constituyéndose un depósito de éste sobre la pieza a tratar. Los principales riesgos proceden de la inhalación de humos de cinc (galvanizado) y de gases procedentes de los quemadores ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ). Los riesgos higiénicos en las operaciones de pintado provienen en general de la inhalación de polvos, aerosoles, gases y vapores, del contacto de la piel con las pinturas y disolventes, así como de la posible ingestión de los mismos (los pigmentos suelen ser óxidos de metales y por tanto pueden producir efectos tóxicos). Este riesgo de intoxicación aumenta considerablemente al utilizarse el pintado por pulverización.

## 2.2. Procesos de Fundición de Metales

Los procesos de fundición son aquellos por los que se obtienen piezas metálicas de dimensiones variadas, mediante la fusión de un metal que vertido en un molde, adquiere la forma deseada. Para conseguir zonas huecas o cavidades se dispone de machos o hoyos que atraviesan estas piezas. Una gran parte de estos procesos tiene una antigüedad próxima al comienzo de nuestra era histórica y la evolución tecnológica presenta graves deficiencias de Seguridad e Higiene, resultando necesario un replanteamiento de esta actividad en cuanto a modernización y automatización de los procesos.

En la etapa de fusión de los metales los principales riesgos higiénicos son los humos metálicos, formados básicamente por óxidos de los metales fundidos. En algún tipo de hornos se añaden metales o sustancias para mejorar la calidad de la fundición, lo que puede generar concentraciones instantáneas elevadas de polvo o humos metálicos que con el monóxido de carbono procedente de los gases puede producir intoxicaciones o mareos.

En la colada (recogida sobre un recipiente o cuchara del metal fundido y su vertido en los moldes), los riesgos más importantes son los humos metálicos. Frecuentemente se añaden polvos exotérmicos en el momento posterior de la colada que producen una concentración elevada de humos, pero de corta duración. Básicamente, los humos metálicos están formados por

óxidos de los metales fundidos, y los gases y vapores desprendidos en la transformación de los aglutinantes orgánicos del polvo de carbón empleados.

### 2.3. Proceso de Soldadura

La soldadura es una de las tareas más utilizadas en la industria metal-mecánica en particular y de uso generalizado por el servicio de mantenimiento de cualquier tipo de industria. Consiste en la unión de piezas metálicas, de igual o distinta naturaleza, utilizando diferentes procedimientos en la que a adherencia se produce con aporte de calor a una temperatura adecuada, con aplicación de presión o sin ella y con adición de metal de aportación o sin ella [2].

Dependiendo de la forma de realizar la unión, existen diferentes procedimientos de soldadura, en la Tabla I y en la Figura 1 se muestran los más utilizados.

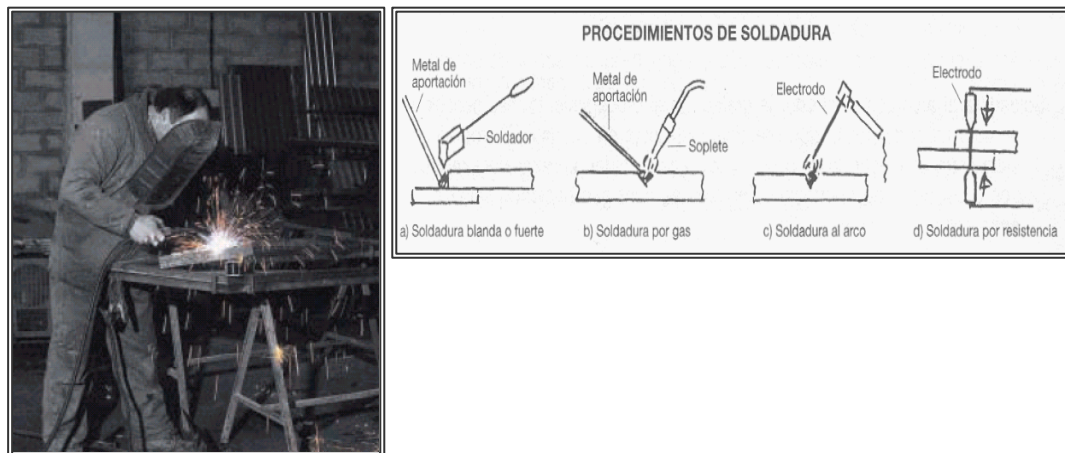


Figura 1.- Procedimientos de soldadura

Tabla I.- Procesos de soldadura

PROCESOS DE SOLDADURA	Indirecta, de aleación o heterogénea	- Soldadura blanda  - Soldadura fuerte		
	Autógena o directa	Por fusión sin presión	- Al arco	- Con gas o al soplete  - Con electrodo de grafito  - Con electrodo metálico  - Con arco sumergido  - Con gas protector (TIG, MIG, MAG, ... )
		Por fusión y presión	- A tope por resistencia - A tope por chisporroteo  - Por puntos  - Por costura	
		Por presión: forja		
		Especiales (plasma, láser, etc.)		

*a) Soldadura Blanda y Fuerte*

Este procedimiento consiste en unir piezas metálicas de igual o diferente naturaleza mediante un metal o aleación de aportación cuya temperatura de fusión es inferior a la de los metales a unir, a los que moja sin fundirlos.

La diferencia entre las soldaduras fuerte y blanda radica en las temperaturas de fusión del metal de aportación (superior o inferior a 425 °C).

Previamente a la operación de fundir el metal de aportación, que puede realizarse por diferentes procedimientos (soplete, soldador,



resistencia, baño de metal fundido, inducción, etc.) las superficies a unir deben ser limpiadas utilizando procedimientos adecuados (mecánicos o químicos) o bien, emplear fundentes para limpiar los óxidos y evitar que éstos se formen durante la soldadura.

#### *b) Soldadura por Gas*

Dentro de este grupo de soldadura se encuentran todos aquellos procedimientos en los que la fusión de las piezas a unir se logra mediante el calor aportado por la llama procedente de la combustión de un gas o gases combustibles (generalmente acetileno y oxígeno) en un equipo denominado soplete, pudiendo utilizar, o no, metal de aportación.

La llama más utilizada es la oxiacetilénica en la que se consigue una temperatura de unos 3200 °C, pero también se pueden utilizar otros tipos de llamas como oxipropano, oxihidrógeno u oxigás natural.

#### *c) Soldaduras al Arco*

Se incluyen dentro de este grupo todos aquellos procedimientos de soldadura en los que el metal se funde debido al calor producido por la acción de un arco voltaico que salta entre el electrodo (consumible o no) y el metal base (pieza a soldar). Las temperaturas alcanzadas en estos procesos superan los 4000 °C.

Los diferentes procedimientos utilizados vienen determinados por:

- Tipo de corriente (continua o alterna) y aparato que la produce (generador o convertidor).
- Tipo de electrodo (de grafito o metálico).
- Revestimiento del electrodo (con o sin revestimiento).
- Atmósfera que rodea al electrodo (CO<sub>2</sub>, argón, helio o mezclas de gases).

Soldadura al arco con electrodo de grafito: Es el procedimiento más sencillo y el primero utilizado. En la actualidad está en desuso. El arco eléctrico salta entre un electrodo de grafito y la pieza a soldar, en atmósfera reductora, con o sin metal de

aportación. También se consigue haciendo saltar el arco entre dos electrodos de grafito (Figura 2).

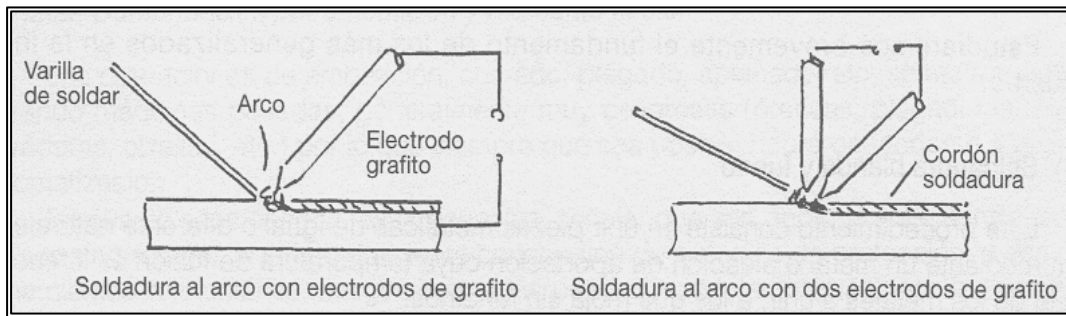


Figura 2.- Soldadura al arco con electrodo de grafito

Soldadura al arco con electrodo metálico: En este caso el arco salta entre las piezas a unir y un electrodo metálico que a su vez actúa como metal de aportación. El electrodo utilizado puede ser sin recubrimiento (desnudo) o con recubrimiento (revestido), siendo este último el más utilizado (Figura 3). La misión del revestimiento es la de dar estabilidad al arco, favorecer el cebado, formar una escoria protectora del metal fundido, crear una pantalla de gases protectores y actuar como desoxidante. En algunas ocasiones se pueden aportar elementos de aleación a la soldadura.

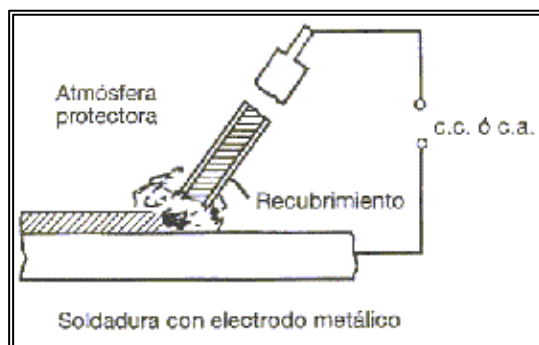


Figura 3.- Soldadura al arco con electrodo metálico

Soldadura por arco sumergido: En este procedimiento se utiliza un electrodo metálico continuo, sin ningún revestimiento que desempeña el papel de conductor y de metal de aportación. El arco, la fusión y la solidificación se encuentran protegidos por la escoria producida (Figura 4).

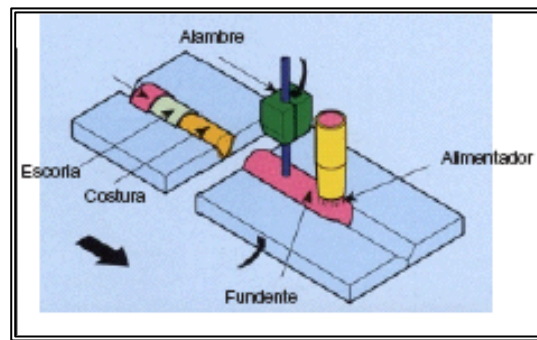


Figura 4.- Soldadura por arco sumergido

*d) Soldaduras al arco con gas protector*

Estos procedimientos de soldadura se caracterizan porque el electrodo, el arco y el baño de soldadura se protegen de la atmósfera mediante un gas protector aportado en la zona de soldadura. Existen diferentes procedimientos según el tipo de electrodo (metálico o de wolframio) y de gas protector, inerte (argón, helio o sus mezclas) o activo ( $\text{CO}_2$ ) (Figura 5).

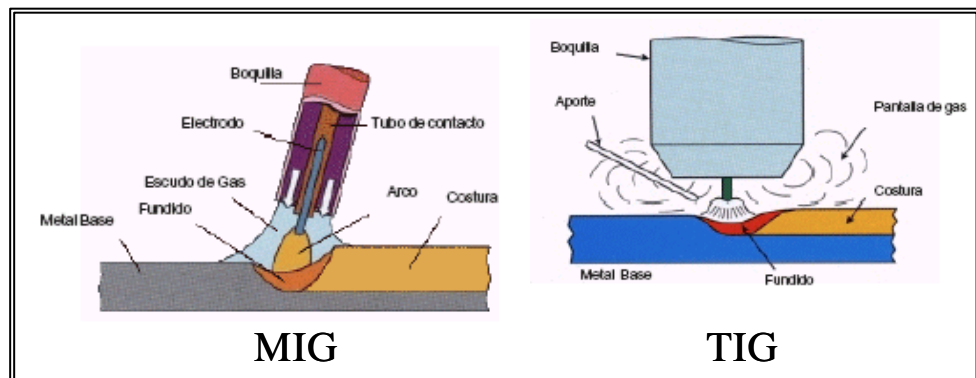


Figura 5.- Soldaduras al arco con gas protector

TIG (Tungsten-Inert-Gas): Este procedimiento de soldadura utiliza un electrodo de wolframio no consumible (WIG), y el gas protector es un gas inerte. Es apto para soldar aceros aleados y aleaciones ligeras y especiales.

MIG (Metal-Inert-Gas): Este procedimiento de soldadura utiliza un electrodo metálico consumible y un gas inerte. Es adecuado

para aceros aleados y no aleados, aluminio, cobre y sus aleaciones.

MAG (Metal-Activ-Gas): Este procedimiento utiliza un electrodo metálico y un gas activo ( $\text{CO}_2$  o mezclas de argón  $\text{CO}_2\text{-O}_2$ ). Se utiliza para soldar aceros no aleados o de baja aleación.

### 2.3.1.- Riesgos del proceso de soldadura

El más común de estos riesgos es el de quemadura térmica, seguido de los cuerpos extraños depositados en los ojos, pequeños traumatismos y alteraciones óseo-articulares. El desarrollo de múltiples técnicas de soldeo unido a la gran cantidad de metales existentes y a las sustancias que unas veces como protectores, otras como aislantes o aglutinantes, se utilizan con ellos, hace que se complique extraordinariamente el examen de los riesgos higiénicos inherentes a este proceso industrial [3].

Los problemas higiénicos que se presentan en las operaciones de soldadura se deben a los humos metálicos procedentes de los materiales a soldar (tanto del metal base como del recubrimiento o material de aportación) y a los humos procedentes de las piezas a soldar (pinturas o productos derivados de sustancias desengrasantes, galvanizado, cromado, etc.).

Por otra parte, las altas temperaturas que se producen en la operación originan la ionización de los gases existentes en el aire formándose ozono y óxidos nitrosos.

Otros tipos de riesgos son los debidos a contaminantes físicos originados por las radiaciones UV, y en algunos tipos de soldadura por ruido, sobre todo en las operaciones de calderería [4].

En la Tabla II se indican los principales contaminantes presentes en todos los tipos de soldadura, sin indicar aquellos otros dependientes del material aportado y/o del tipo de soldadura, los cuales se comentarán a continuación.

Tabla II.- Contaminantes presentes en todo tipo de soldadura

Origen de los Contaminantes		Contaminantes Presentes
Material base	Acero de carbono	Óxidos de Fe, Mn, etc.
	Acero inoxidable	Óxidos de Cr, Ni, etc.
	Aluminio/aleaciones	Óxidos de Al, Cu, etc.
Recubrimiento de metal soldado	Galvanizado	Óxidos de Zn
	Cromado	Óxidos de Cr
	Niquelado	Óxidos de Ni
	Pintado con minio	Óxidos de Pb
	Restos desengrasantes	Fosgeno
	Restos de aceites	Acroleína

Los riesgos higiénicos específicos de cada uno de los tipos de soldadura son los siguientes [5]:

a) Soldadura blanda y fuerte (soldadura heterogénea):

Los principales riesgos de este tipo de soldadura son:

- Humos metálicos procedentes de los metales o aleaciones fundidas (Sn, Pb, Ag, Cu, Zn, etc.).
- Gases procedentes de los fundentes (fluoruros, cloruros, boratos, óxidos).

b) Soldaduras por gas:

Los principales riesgos de este tipo de soldadura son:

- Posibilidad de asfixia por disminución de oxígeno del aire en los locales cerrados debido al acetileno, propano, hidrógeno o gas natural).
- Producción de CO procedente de una combustión incompleta de sustancias en contacto con la llama.
- Probabilidad de fugas del acetileno con riesgos de asfixia o explosión.
- Humos metálicos procedentes de los metales base, recubrimientos o del metal de aportación.
- Gases procedentes de los fundentes.
- Producción de gases nitrosos por oxidación del nitrógeno del aire y en presencia de llama.

## c) Soldaduras al arco:

Soldadura al arco con electrodo de grafito: En este tipo de soldadura pueden encontrarse los siguientes contaminantes:

- Radiaciones UV.
- Humos metálicos procedentes del metal base y metal de aportación.
- Ozono y óxidos de nitrógeno en gran cantidad ( $O_3$ ,  $NO_2$  y  $NO$ ).
- Gases procedentes del recubrimiento del electrodo.

Soldadura al arco con electrodo metálico: En este tipo de soldadura los riesgos higiénicos más importantes son debidos a:

- Radiaciones UV.
- Temperatura del arco.
- Fusión y volatilización de los metales fundidos.
- Fusión y volatilización de los metales del recubrimiento y desoxidantes.
- Operaciones de limpieza.

La temperatura del arco motivará la formación de ozono y vapores nitrosos a partir del oxígeno y nitrógeno atmosférico. La volatilización de los metales fundidos se produce debido a la alta temperatura del arco. La diversidad de materiales utilizados en la fabricación de los electrodos motiva la aparición de gran cantidad de gases y humos producidos por los desoxidantes, revestimientos y metal de aportación. Así, dependiendo del tipo de revestimiento se encuentran presentes en el ambiente distintos contaminantes (Tabla III).

Tabla III.- Contaminantes presentes en el ambiente según el tipo de revestimiento del electrodo

Tipo de Revestimiento	Componente Mayoritario	Contaminantes Presentes
ÁCIDO	$SiO_2$	Sílice amorfa
BÁSICO	$F_2Ca$ (fluorita)	Fluoruros de Na, K, Ca
RUTILO	$TiO_2$	Óxido de titanio

---

Soldadura por arco sumergido: En este procedimiento el arco se encuentra protegido por el fundente, existiendo como contaminantes presentes los humos metálicos procedentes del electrodo y los gases procedentes de los fundentes utilizados.

Soldadura al arco con gas protector: En los procedimientos de soldadura TIG, MIG o MAG se presentan los mismos riesgos higiénicos que en la soldadura al arco con electrodo recubierto, si bien además, presentan las particularidades debidas a los gases de protección utilizados (argón, ozono,  $\text{CO}_2$ , etc.). Así, las radiaciones UV muy intensas pueden producir ozono a partir del oxígeno del aire hasta una distancia superior a un metro. El argón, aunque no es tóxico, en caso de fugas puede ser peligroso al desplazar el oxígeno del aire y producir asfixia. En cuanto al  $\text{CO}_2$ , no sólo debe tenerse en cuenta su toxicidad sino también la posibilidad de formar a partir de él CO.

Como resumen a todo lo expuesto, se puede concluir que la mayoría de los procedimientos de soldadura presentan riesgos higiénicos producidos por:

- Humos metálicos: Estos son suspensiones en el aire de partículas sólidas metálicas generadas en un proceso de condensación del estado gaseoso. A menudo va acompañada de una reacción química generalmente de oxidación. Estos humos se pueden generar en mayor o menor abundancia dependiendo del tipo de aleación, las temperaturas de fusión y vaporización de los metales presentes y, lógicamente de las temperaturas alcanzadas en el proceso de fusión. El plomo, cadmio y cinc tienen bajos los valores de punto de fusión y vaporización por lo que se forman fácilmente humos metálicos al soldar estos metales. Así mismo, hay que tener en cuenta el tipo de soldadura que se emplea, siendo aquella que alcanza mayor temperatura la que con más facilidad producirá humos metálicos. La formación de Cr(VI) se

puede deber a las reacciones que se pueden producir entre los óxidos de Cr(III) y el ozono formado por la radiación UV [6-7].

Entre los humos metálicos que se pueden encontrar en el proceso de soldeo están:

- \* Tóxicos e irritantes: cadmio, cromo, manganeso, cinc, mercurio, níquel, titanio, vanadio, plomo y molibdeno.
- \* Neumoconióticos de efectos muy peligrosos: como en el caso de los metales (berilio ("berilosis") o cobre ("fiebre de humos metálicos").
- \* Neumoconióticos de efectos poco peligrosos: como es el caso de los metales hierro ("siderosis"), aluminio y estaño.

La IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer), en 1990, inscribe a los humos de soldadura como posibles sustancias cancerígenas del grupo 2B (carcinogénicas para el hombre). Los posibles responsables son los compuestos de níquel y cromo [8-11]. La legislación española considera a los compuestos insolubles de níquel y a los compuestos de Cr(VI) como sustancias C1 (Sustancia carcinogénica de primera categoría): "Sustancias que se sabe, son carcinogénicas para el hombre. Se dispone de elementos suficientes para establecer la existencia de una relación de causa/efecto entre la exposición del hombre a tales sustancias y la aparición del cáncer" [12].

- Gases: desprendidos o utilizados durante la operación de soldadura. Estos gases pueden ser vapores nitrosos, como el NO<sub>2</sub>, que se presenta en mayor porcentaje en la soldadura al arco con electrodos revestidos. Los vapores nitrosos se producen por la oxidación del nitrógeno y el ozono por la emisión de radiaciones UV. Los gases protectores (argón, helio, CO<sub>2</sub>) pueden producir asfixia. Los gases tóxicos que provienen de los restos que puedan encontrarse en las piezas soldadas como el fosgeno de los disolventes o la acroleína de los aceites.

Es importante señalar que la cantidad de gases o humos inhalados por el operario depende en gran medida de su



colocación y distancia al electrodo, ya que éste debe colocarse de forma que los contaminantes sean captados rápidamente sin pasar delante de él.

Entre otros riesgos a considerar en soldadura, desde el punto de vista de la seguridad, se pueden señalar los derivados de:

\* Soldadura oxiacetilénica:

- Características de los gases utilizados (incendios y explosiones).
- Condiciones de transporte y almacenamiento de las botellas de los gases.
- Proyección del metal fundido o contacto con piezas calientes (quemaduras).
- Proyección de partículas (daños en los ojos).
- Características de las piezas a soldar (cortes, caídas de objetos, etc.).
- Características del puesto de trabajo (caídas a distinto nivel).

\* Soldadura eléctrica:

- Contactos eléctricos directos en circuitos de acometida y/o soldeo.
- Contactos eléctricos indirectos.
- Proyección del metal fundido, características de las piezas a soldar y del puesto de trabajo.
- Caídas a distinto nivel, etc.

### 2.3.2. Sistemas de prevención del riesgo higiénico en las operaciones de soldadura

La exposición a humos constituye el principal riesgo químico en la mayoría de los procesos de soldadura. Estos humos se forman en el aire al enfriarse y condensarse las sustancias volatilizadas por el calor en el proceso de soldadura y son generados por los metales de base soldados, por los electrodos y sus revestimientos, las varillas de aportación, los fundentes, etc.,

utilizados al trabajar, así como por los materiales “extraños”, como los metales y capas de pintura presentes en el metal de base, los residuos de los materiales de limpieza y otros. Como norma, el tamaño de las partículas de los humos es micrométrico o submicrométrico, pero éstas pueden fusionarse y formar agregados mayores. La mayoría de las partículas de humo son “respirables” y, por tanto pueden penetrar profundamente en el sistema respiratorio y depositarse en el mismo. Los humos de soldadura suelen contener óxidos de los metales sobre los que se trabaja (en especial, en el caso del acero, el hierro, el cromo, el níquel, el manganeso, el vanadio y otros) y de los electrodos, silicio, aluminio, magnesio y óxidos alcalinos y alcalinotérreos (sobre todo de bario), y pueden incluir cantidades sustanciales de fluoruros y productos de descomposición y residuos de pintura, aceite y disolvente. Al soldar metales no ferrosos, los humos generados pueden contener óxidos de éstos y pequeñas cantidades de impurezas altamente tóxicas, como compuestos de arsénico y antimonio.

La cantidad de humos formados depende del tipo de proceso de soldadura, pero pueden alcanzarse niveles de 2-3 g/min o incluso superiores (por ejemplo, en la soldadura con arco eléctrico manual o con electrodos con núcleo de fundente) [13-22]. Por tanto, en lo que se refiere a los sistemas de prevención y control, es importante señalar que si bien cuando el puesto de soldadura se encuentra al aire libre los riesgos son mínimos, cuando el puesto se encuentra en lugar cerrado, el riesgo se acrecienta a medida que disminuyen las dimensiones del local, debiendo recurrir a la ventilación por dilución o a la extracción localizada [23-25].

Se pueden distinguir dos puestos de trabajo de soldadura: fijos (Figura 6) y móviles (Figura 7). En el primero, para conseguir una captación eficaz de los gases y humos se puede utilizar un sistema de mesa con extracción a través de rendijas. En el segundo, el caudal de aspiración depende en gran medida de la distancia al punto de soldadura. Como complemento a la extracción localizada, nunca como solución al problema, se debe recurrir cuando sea posible a la ventilación general (Figura 8). La ventilación es necesaria siempre en los sitios donde se suelda continuamente, ya que los humos se van acumulando.

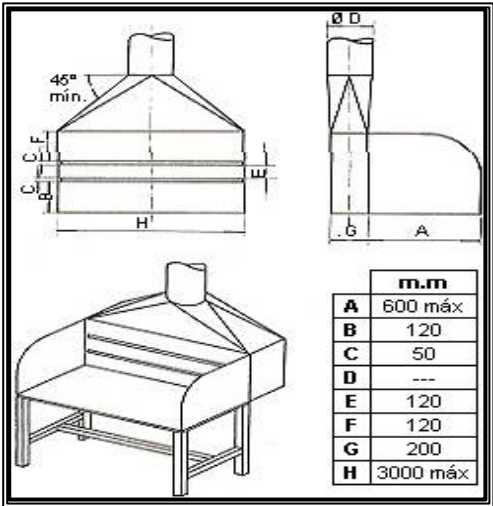


Figura 6.- Puesto de soldadura fijo

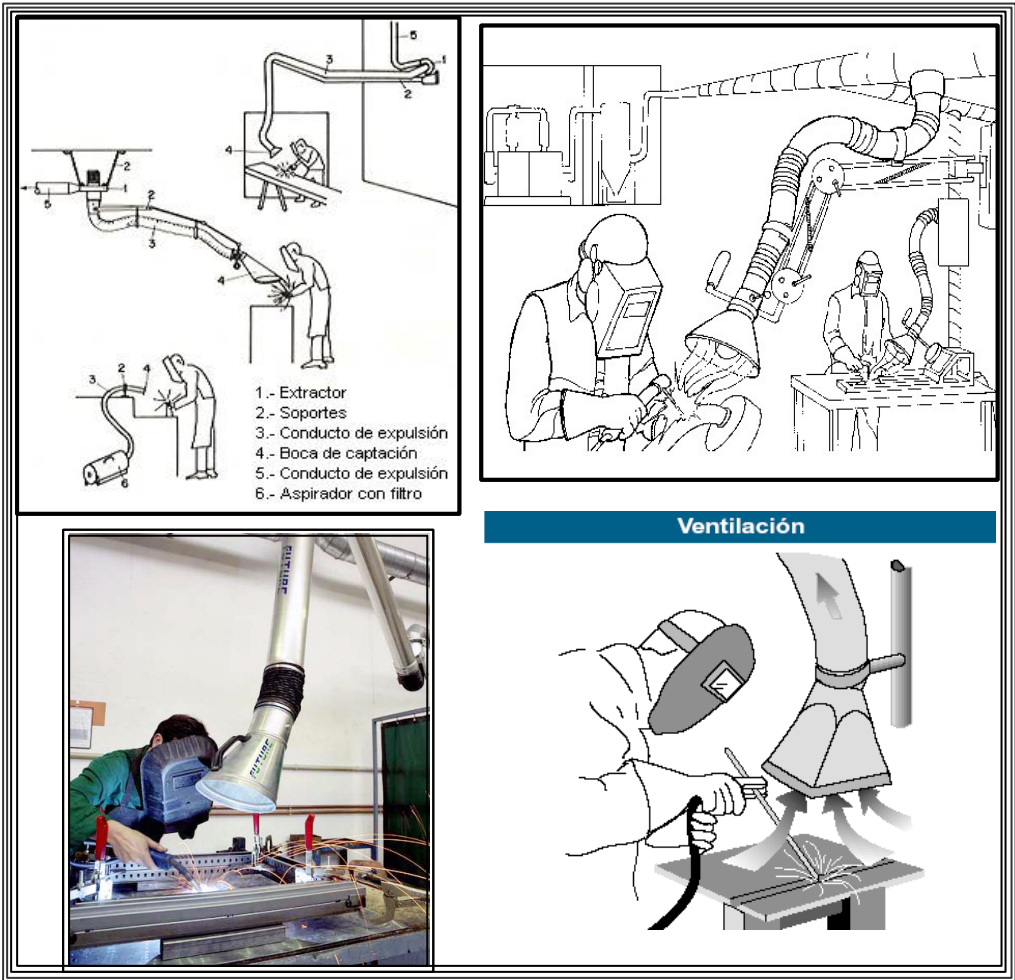


Figura 7.- Puesto de soldadura móvil

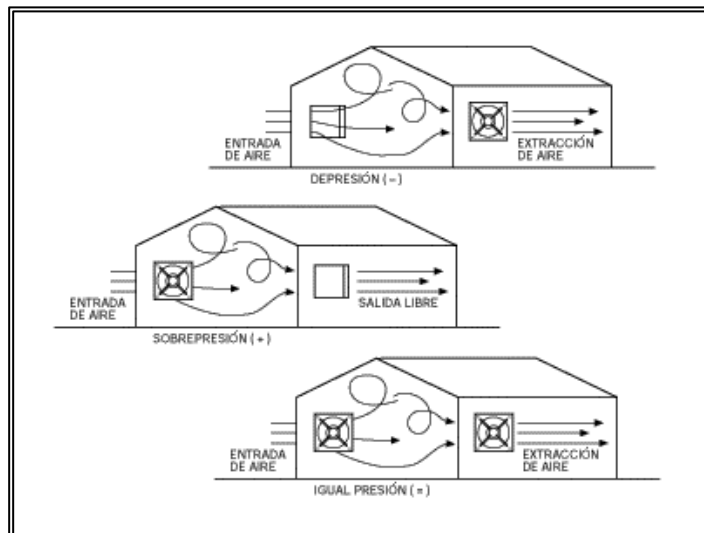


Figura 8.- Ventilación general

Esta necesidad se hace mayor cuando los locales son reducidos o se suelda dentro de tanques, depósitos, etc.

Además, también se puede realizar la extracción de los gases y humos procedentes de los trabajos de soldadura mediante el uso de sistemas extractores incorporados en la pistola de soldadura (Figura 9) o en la pantalla de protección (Figura 10).

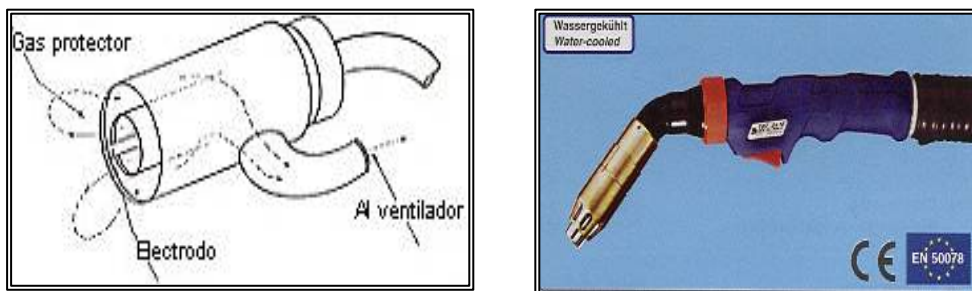


Figura 9.- Extracción incorporada a la pistola de soldadura



Figura 10.- Extracción incorporada en la pantalla de protección

Por otra parte, será preciso recurrir a la protección individual (Figura 11) para proteger al trabajador de los riesgos higiénicos de la soldadura mediante cascos o pantallas de protección para hacer frente a los riesgos de las radiaciones UV, chispas y calor. Estas pantallas están dotadas de cristal con el grado de protección adecuado al tipo de soldadura, y si fuera preciso, el soldador deberá usar equipos de protección respiratoria. Así mismo, deberá utilizar ropa adecuada (delantal, polainas, guantes y manguitos) de cuero para evitar riesgos de quemaduras.



Figura 11.- Protección individual del soldador

#### 2.4. Evaluación del Riesgo Higiénico

En la Figura 12 se representa la forma de actuar para determinar el riesgo higiénico por soldadura partiendo del conocimiento de los valores límites ambientales (VLAs) que se indican para los principales contaminantes presentes en soldadura (Tabla IV), concentraciones de los contaminantes obtenidas mediante muestreo y análisis, y los distintos tiempos de exposición.

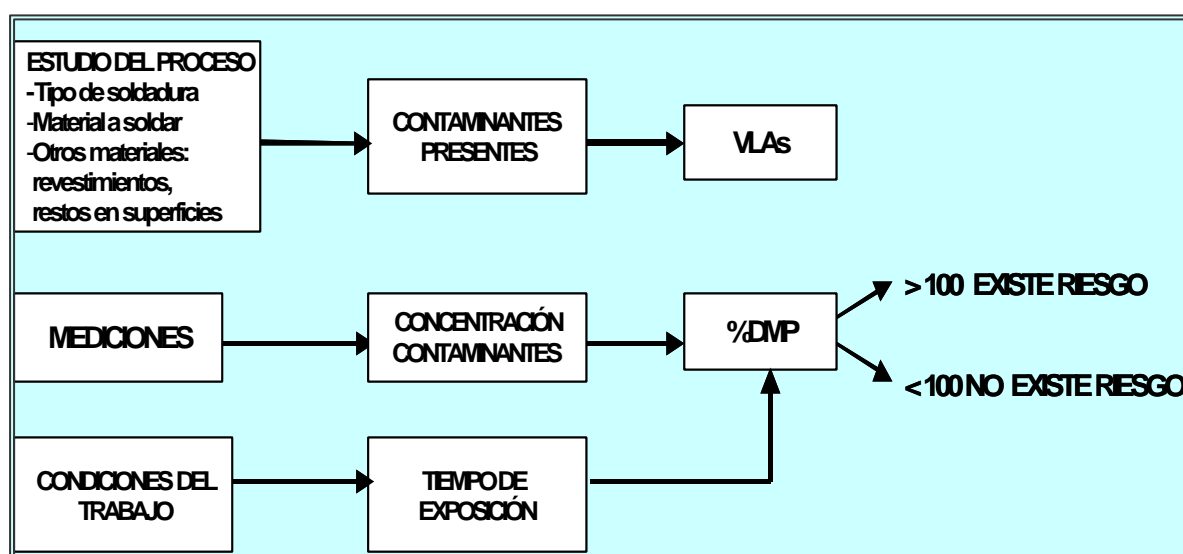


Figura 12.- Forma de actuar para determinar el riesgo higiénico por soldadura. %DMP: dosis máxima permisible

Por tanto, para la evaluación se debe disponer para cada uno de los contaminantes de los límites de exposición. En España durante mucho tiempo se utilizaron los valores TLVs (Threshold Limit Value) establecidos por la ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) hasta que se aprobó el Real Decreto 374/2001 [26], donde se definen los valores límites ambientales y biológicos y se establecen valores límites de exposición profesional obligatorios para aquellos agentes que tienen fijado un valor límite indicativo a escala comunitaria. Remitiendo, en ausencia de éstos, a los valores límite ambientales contenidos en el Documento “Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España”, publicado por el INSHT (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo) [27]. Este documento presenta las siguientes características:

- 
- Los valores establecidos deben ser considerados como orientativos o recomendados.
  - Contempla valores límites para exposición a agentes químicos, principalmente por inhalación, previéndose la inclusión posterior de valores límite biológicos.
  - Su aplicación se circunscribe al ámbito laboral.
  - La relación de valores límite deberá ser ampliada y revisada anualmente.
  - La aplicación de los valores límite establecidos para evaluar y controlar los riesgos derivados de la exposición profesional a agentes químicos deberá realizarse siguiendo los criterios establecidos en el documento.

Tabla IV.- Valores límites ambientales (VLAs) para los contaminantes presentes en soldadura

CONTAMINANTES PRESENTES EN SOLDADURA					
Contaminantes	VLA-ED mg/m <sup>3</sup>	VLA-EC mg/m <sup>3</sup>	Contaminantes	VLA-ED mg/m <sup>3</sup>	VLA-EC mg/m <sup>3</sup>
- Óxido de Fe(III)	5	-	- Ozono	0,1-0,2	-
- Óxido de Cr	0,5	-	- NO <sub>2</sub>	92	-
- Óxido de Al	10	-	- CO	29	-
- Níquel:			- CO <sub>2</sub>	9150	15000
Compuestos insolubles	0,2	-	- Fosgeno	0,08	0,4
Compuestos solubles	0,1	-	- Fluoruros inorgánicos	2,5	-
Níquel metal	1	-	- Humos de sílice (Fracción respirable)	2	-
- Óxido de cobre (humos)	0,2	-	- Humos de soldadura	5	-
- Plomo inorgánico y derivados	0,15	-	- Cr(VI) compuestos solubles	0,05	-
- Óxido de cinc (humos)	5	-	- Cr(VI) compuestos insolubles	0,01	-
- Cd elemental y compuestos:					
Fracción inhalable	0,01	-			
Fracción respirable	0,002	-			
- Co elemental y compuestos inorgánicos	0,02	-			
- Be y compuestos	0,002	-			
- Óxido de estaño	2	-			
- Dióxido de titanio	10	-			
- Pentóxido de V	0,05	-			
- Manganeseo: Compuestos inorgánicos	0,2	-			
- Óxido de Mg	10	-			
- Hg elemental y compuestos inorgánicos	0,025	-			



Valores Límite Ambientales (VLA): Son valores de referencia para las concentraciones de los agentes químicos en el aire y representan condiciones a las cuales se cree, basándose en los conocimientos actuales, que la mayoría de los trabajadores pueden estar expuestos 8 horas al día y 40 semanales, durante toda su vida laboral, sin sufrir efectos adversos para su salud. Estos valores sirven exclusivamente para la evaluación y control de los riesgos por inhalación de los agentes químicos incluidos en la lista de valores. Cuando uno de estos agentes se puede absorber por vía cutánea, el agente aparece señalado en la lista con la notación “vía dérmica”, lo que deberá conllevar el adoptar las medidas oportunas para prevenir la absorción cutánea. Los valores límite para gases y vapores vienen establecidos en mL/m<sup>3</sup> (ppm), valor independiente de las variables temperatura y presión atmosférica, pudiendo también expresarse en mg/m<sup>3</sup> para una temperatura de 20°C y una presión de 101,3 Kpa, valor que depende de las citadas variables. La conversión de una a otra unidad se realiza mediante la expresión:

$$\boxed{\text{VLA}(\text{mg/m}^3) = \frac{\text{VLA}(\text{ppm}) \times \text{Pm}}{24,04}} \quad (1)$$

Pm: Peso molecular del producto químico

VLA-ED (Valor Límite Ambiental-Exposición Diaria): Es el valor de referencia para la exposición diaria (ED). Entendiendo por éste la concentración media del agente químico en la zona de respiración del trabajador, o calculada de forma ponderada con respecto al tiempo, para la jornada laboral real y referida a una jornada de 8 horas diarias. Se calcula mediante la expresión:

$$\boxed{\text{ED} = \frac{\sum_{i=1}^i C_i t_i}{8}}$$

(2)

Ci: concentración del contaminante  
t<sub>i</sub>: tiempo de exposición en horas,  
asociado a cada valor de  
concentración

Se debe disponer el valor del VLA-ED para cada uno de los contaminantes en aquellos lugares de trabajo en los que se fabriquen, manipulen o utilicen sustancias de conocidos efectos irritantes, tóxicos, etc.,

que puedan afectar a la salud del trabajador y que debido a sus propiedades o a las características del proceso puedan pasar al ambiente. Cuando la sustancia no disponga de VLA-ED, existiendo sospecha por sus características fisicoquímicas de que puede producir daño en la salud del trabajador, deberán adoptarse las mismas medidas de precaución que para aquellas otras a las que su acción pudiera asimilarse.

VLA-EC (Valor Límite Ambiental-Exposición de Corta Duración): Es el valor de referencia para el valor de corta duración. Entendiendo por ésta la concentración media del agente químico en la zona de respiración del trabajador, medida o calculada para cualquier periodo de 15 minutos a lo largo de la jornada laboral excepto para aquellos agentes para los que en la lista de Valores Límite se especifique un periodo de referencia menor. Lo habitual es determinar las EC para los periodos de máxima exposición, tomando muestras de 15 minutos de duración en cada uno de ellos. Si el instrumento utilizado proporciona varias concentraciones dentro del citado periodo, la EC correspondiente se calcula utilizando la expresión:

$$EC = \frac{\sum_{i=1}^i C_i t_i}{15}$$

(3)

C<sub>i</sub>: concentración del contaminante dentro de cada periodo de 15 min.  
t<sub>i</sub>: tiempo de exposición en minutos, asociado a cada valor de concentración

El valor VLA-EC no debe ser superado por ninguna EC a lo largo de la jornada laboral. Para aquellos agentes químicos que tienen efectos agudos reconocidos, pero cuyos principales efectos tóxicos son de naturaleza crónica, el VLA-EC constituye un complemento del VLA-ED y por tanto, la exposición a estos agentes ha de valorarse teniendo en cuenta ambos índices. Mientras que si los agentes tienen efectos, principalmente agudos (gases irritantes), su valoración debe hacerse utilizando el VLA-EC. Por tanto, se debe tener los valores de VLA-EC para cada uno de los contaminantes presentes en el lugar de trabajo en aquellos lugares de trabajo en los que, además de concurrir las circunstancias anteriores, los trabajadores se encuentran expuestos a altas

concentraciones durante cortos periodos de tiempo. En aquellos casos en que la sustancia contaminante no tenga asignado este valor se utilizarán los Límites de Desviación (LD).

Límites de Desviación (LD): Pueden utilizarse para controlar las exposiciones por encima del VLA-ED, dentro de una misma jornada de trabajo, de aquellos agentes químicos que lo tengan asignado. Son complementarios de los VLA y tienen un fundamento estadístico. Para los agentes químicos que tienen asignado VLA-ED, pero no VLA-EC se establecen:

- 3 x VLA-ED que no deberá superarse durante más de 30 minutos en la jornada de trabajo.
- 5 x VLA-ED que no se debe superar en ningún momento.

A partir del conocimiento de los VLA-ED, VLA-EC, concentración de contaminante en el ambiente ( $C_i$ ) y del tiempo de exposición al riesgo en horas/día ( $t$ ), se procederá según se trate de un solo contaminante o de varios contaminantes.

a) *Evaluación del riesgo higiénico con un solo contaminante*

Se procede a determinar el porcentaje de "Dosis Máxima Permisible" (%DMP) a partir de la expresión:

$$\boxed{\%DMP = \frac{C_i}{VLA - ED} \times \frac{t}{8} \times 100 = K} \quad (4)$$

Resultando que:    si  $K > 100$  Existe riesgo higiénico  
                              si  $K < 50$  No existe riesgo higiénico  
                              si  $50 < K < 100$  Existe riesgo higiénico dudoso

Este cálculo presenta la ventaja de permitir cuantificar los riesgos de forma correcta, aunque en su aplicación deberán tenerse en cuenta las siguientes circunstancias:

- Si el valor de  $C_i$  del contaminante es superior a 5x VLA-ED es este valor y no el %DMP el que determinará la existencia del

riesgo, ya que aún con valores muy bajos de %DMP, para cortas exposiciones, puede existir riesgo higiénico.

- Si los tiempos de exposición del trabajador al riesgo son cortos y las concentraciones en el ambiente superan el VLA-ED deberán tenerse en cuenta los LD.
- En casos justificados se podrá realizar una valoración semanal en lugar de diaria (siempre que se trate de un agente químico de largo periodo de inducción y existan variaciones sistemáticas), en cuyo caso la comparación con el VLA-ED se realizará con la Exposición Semanal (ES), calculada a partir de la expresión:

$$ES = \frac{\sum_{i=1}^i ED_i}{5} \quad (5)$$

b) *Evaluación del riesgo higiénico con varios contaminantes presentes:*

En esta circunstancia se pueden dar dos posibilidades:

- Los efectos son independientes para cada uno de los contaminantes. En este caso deberá cumplirse para todos ellos que:

$$\begin{array}{lll} ED_1 < VLA-ED_1 & y & ECmax_1 < VLA-EC_1 \\ ED_2 < VLA-ED_2 & y & ECmax_2 < VLA-EC_2 \\ ED_3 < VLA-ED_3 & y & ECmax_3 < VLA-EC_3 \\ \dots & y & \dots \\ ED_i < VLA-ED_i & y & ECmax_i < VLA-EC_i \end{array}$$

- Los efectos son aditivos o no se tiene certeza de que sus efectos son exclusivamente independientes. En este caso se calculará el valor de K de la siguiente forma:

$$\frac{E_1}{VLA_1} + \frac{E_2}{VLA_2} + \frac{E_3}{VLA_3} + \dots + \frac{E_i}{VLA_i} = K \quad (6)$$

Resultando que: si  $K > 1$  Existe riesgo higiénico  
 si  $K < 0,5$  No existe riesgo higiénico  
 si  $0,5 \leq K \leq 1$  Existe riesgo higiénico dudoso

Además, deberá seguir cumpliéndose para cada contaminante independientemente las condiciones establecidas en el caso anterior. El valor del VLA de la mezcla se puede determinar a partir de la expresión anterior en la que:

$$\sum_{n=1}^i \frac{E_i}{VLA_i} = \frac{E_{mezcla}}{VLA_{mezcla}} \quad (7)$$

Por lo que el  $VLA_{mezcla}$  será igual a:

$$VLA_{mezcla} = \frac{E_{mezcla}}{\sum_{n=1}^i \frac{E_i}{VLA_i}} \quad (8)$$

### 3.- METALES: PROPIEDADES Y TOXICIDAD

La determinación de metales en el medioambiente laboral resulta muy importante debido a la toxicidad de ciertos metales incluso en concentraciones traza. Aunque, en general, esta toxicidad depende de la concentración a la que se puedan encontrar [28-29].

A continuación se exponen brevemente las principales características del cadmio, cinc, cobalto, cobre, cromo, hierro, manganeso, níquel y plomo [30].

#### 3.1. Cadmio

Distribución y usos: Las propiedades químicas y físicas del cadmio son muy similares a las del cinc, y con frecuencia coexiste con este metal en la naturaleza. El cadmio es muy resistente a la corrosión y se utiliza para su electrodeposición en otros metales, especialmente el acero y el hierro. Los tornillos, las tuercas de seguridad, los pestillos y diversas partes de los aviones y vehículos de motor están tratados con cadmio con el fin de protegerlos de la corrosión. Los compuestos de cadmio se utilizan también como pigmentos y estabilizadores de plásticos y en ciertas aleaciones. Las baterías pequeñas, portátiles y recargables de cadmio que se utilizan, por ejemplo, en los teléfonos móviles representan un uso del cadmio cada vez mayor. Este metal puede estar presente como material de recubrimiento en superficies que se van a soldar. Existen diversas sales de cadmio. La más importante es el estearato de cadmio, que se utiliza como estabilizador térmico en los plásticos de PVC (cloruro de polivinilo). El sulfuro de cadmio y el sulfoseleniuro de cadmio se utilizan como pigmentos amarillo y rojo en plásticos y tintes. El sulfuro de cadmio se utiliza también en células solares y fotográficas. El cloruro de cadmio se emplea como fungicida, componente de los baños galvanoplásticos, colorante en pirotecnia, aditivo en las soluciones de estañado y mordente en la tinción e impresión de textiles. También se utiliza para la producción de determinadas películas fotográficas, para la fabricación de espejos especiales y para el recubrimiento de tubos electrónicos de vacío. El óxido de cadmio se utiliza en galvanoplastia, como materia prima para los estabilizadores térmicos de PVC y como componente de las aleaciones

de plata, pigmentos fosforescentes y semiconductores, así como para el endurecimiento de cristales o el vitrificado de cerámica.

**Riesgos y toxicidad:** La absorción gastrointestinal del cadmio ingerido es aproximadamente de un 2 a un 6 % en condiciones normales. Las personas que poseen pocas reservas de hierro en su organismo, lo que se traduce en una baja concentración de ferritina en el suero, pueden presentar una absorción de cadmio mucho mayor, de hasta un 20 % de la dosis administrada. Además, se pueden absorber cantidades significativas de este metal por vía pulmonar, como consecuencia de la inhalación de humo de tabaco o por la exposición profesional al polvo de cadmio atmosférico. Se calcula que la absorción pulmonar del polvo de cadmio respirable inhalado es del 20 al 50 %. Tras la absorción, ya sea por vía digestiva o respiratoria, el cadmio se transporta al hígado, donde se inicia la producción de una proteína de bajo peso molecular que se une al cadmio, la metalotioneína. La eliminación del cadmio es muy lenta, y por ello se acumula en el organismo, aumentando su concentración con la edad y el tiempo de exposición.

La inhalación de compuestos de cadmio en concentraciones en el aire superiores a 1 mg Cd/m<sup>3</sup> durante 8 horas o en concentraciones superiores durante períodos más cortos puede producir una neumonitis química y, en los casos graves, edema pulmonar. Generalmente, los síntomas aparecen entre 1 y 8 horas después de la exposición y son similares a los de la gripe o la fiebre por humos de metales. Pueden producirse exposiciones a concentraciones de cadmio en la atmósfera superiores a 5 mg Cd/m<sup>3</sup> durante las operaciones de soldadura, corte al plasma o fundición de aleaciones de cadmio

Se han producido casos de intoxicación crónica por cadmio tras exposiciones profesionales prolongadas a humos o polvo de óxido de cadmio y a estearatos de cadmio. Los efectos asociados con la intoxicación crónica por cadmio pueden ser locales, en cuyo caso se afectan las vías respiratorias, o sistémicos, debidos a la absorción de cadmio. Las alteraciones sistémicas incluyen lesiones renales, con proteinuria y anemia. Los principales síntomas derivados de la exposición a cadmio en el aire son los correspondientes a una neumopatía de carácter obstructivo, en forma de enfisema, en tanto que la insuficiencia y las lesiones renales constituyen las características más relevantes de las exposiciones prolongadas a niveles más bajos de cadmio en

el aire de las naves de trabajo o de las intoxicaciones por alimentos contaminados con cadmio. En los trabajadores expuestos a niveles elevados de cadmio se encuentra frecuentemente una ligera anemia hipocrómica que podría deberse, por una parte, a un incremento de la destrucción de los hematíes y, por otra, a un déficit de hierro [31]. El enfisema pulmonar se considera un posible efecto de la exposición prolongada al cadmio existente en el aire cuando se encuentra en concentraciones superiores a  $0,1 \text{ mg Cd/m}^3$ . En los casos de exposición de larga duración a niveles bajos de cadmio, los riñones son los órganos críticos, es decir, los primeros afectados. El cadmio se acumula en la corteza renal. Con el fin de prevenir la insuficiencia renal, en especial si la exposición profesional a los humos y polvo de cadmio puede durar hasta 25 años (con una jornada laboral de 8 horas y 225 días de trabajo/año), se recomienda mantener la concentración media de cadmio respirable en niveles inferiores a  $0,01 \text{ mg/m}^3$  [32].

Varios estudios epidemiológicos demuestran una relación dosis-respuesta y un aumento en la mortalidad por cáncer pulmonar en los trabajadores expuestos al cadmio. La interpretación se complica por la exposición simultánea a otros metales que son o se sospecha que pueden ser cancerígenos [33]. En 1993, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) evaluó el riesgo de cáncer derivado de la exposición al cadmio y concluyó que debía considerarse cancerígeno para el hombre.

### 3.2. Cinc

Distribución y usos: El cinc se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y constituye aproximadamente un 0,02 % de la corteza terrestre. Adopta la forma de sulfuro (esfalerita), carbonato, óxido o silicato (calamina) de cinc, combinado con muchos minerales. Cuando se expone a la acción del aire, el cinc se recubre de una película de óxido que protege al metal de oxidaciones posteriores. En esta resistencia a la corrosión atmosférica reside uno de sus principales usos: la protección del acero mediante galvanización. La capacidad del cinc para proteger a los metales ferrosos de la corrosión puede potenciarse mediante electrólisis. El cinc actúa como ánodo con el hierro y otros metales estructurales, a excepción del aluminio y el manganeso, y así, las sustancias corrosivas atacan preferentemente al cinc, y se protegen



---

los demás metales. Esta propiedad se aprovecha también en otras aplicaciones importantes, como en la utilización de planchas de cinc como ánodos para la protección catódica de los cascos de buques, tanques enterrados, etc. El cinc metálico se puede troquelar para la fabricación de piezas de automóviles, equipos eléctricos, herramientas de maquinaria ligera, equipos informáticos, juguetes y artículos ornamentales. También puede laminarse para la obtención de planchas destinadas a techados y cubiertas, forros de pilas secas, placas de fotograbado, etc. Además, puede alearse con cobre, níquel, aluminio y magnesio. Cuando se alea con cobre, se obtiene el importante grupo de aleaciones denominadas bronce. El óxido de cinc se utiliza como pigmento para la fabricación de pinturas, lacas y barnices, y como carga en plásticos y caucho. También tiene aplicación en la fabricación de cosméticos, cementos de fraguado rápido y en la industria farmacéutica. Es útil para la fabricación de vidrio, ruedas de automóviles, cerillas, pegamento blanco y tintas para imprenta, y como semiconductor en la industria electrónica. El cromato de cinc se utiliza en pigmentos, pinturas, barnices y lacas, y en la fabricación del linóleo. También se emplea como inhibidor de la corrosión para metales y laminados epoxi. El cianuro de cinc se utiliza para electrodeposición sobre metales y en el proceso de extracción del oro. Tiene aplicación también como reactivo químico y pesticida. El sulfato de cinc se utiliza como astringente, conservante de pieles y maderas, decolorante de papel, adyuvante de pesticidas y fungicida. Se emplea también como agente incombustible y tensoactivo en el proceso de flotación por espuma. Otro uso es el tratamiento del agua, y la tinción y estampado de tejidos. El sulfuro de cinc se utiliza como pigmento para pinturas, lienzos, cuero, tintas, lacas y cosméticos. El fosfuro de cinc se emplea principalmente como rodenticida. El cloruro de cinc tiene numerosos usos en la industria textil durante el teñido, estampado y apresto de los tejidos. Es un componente del cemento para metales, los dentífricos y las pastas de soldadura. Se utiliza solo o con fenol y otros antisépticos para conservar las traviesas de los ferrocarriles. Es útil para el grabado del metal y la fabricación de asfalto. Sirve como agente vulcanizante para el caucho, retarda la combustión de la madera e inhibe la corrosión en el tratamiento del agua.

*Riesgos y toxicidad:* El cinc es un nutriente esencial. Es un componente de las metaloenzimas que participan en el metabolismo de los ácidos nucleicos y en la síntesis de las proteínas. El cinc no se acumula en el organismo y los expertos en nutrición recomiendan una ingesta diaria mínima de cinc. Algunas de las manifestaciones clínicas de la carencia crónica de cinc en el hombre son: retraso del crecimiento, hipogonadismo en los varones, alteraciones cutáneas, falta de apetito, letargo mental y retardo en la cicatrización de las heridas. En general, las sales de cinc son astringentes, higroscópicas, corrosivas y antisépticas. Su acción precipitante sobre las proteínas constituye la base de sus efectos astringente y antiséptico y se absorben con relativa facilidad por vía cutánea. Varias sales de cinc pueden entrar al organismo por inhalación, a través de la piel o por ingestión y producir intoxicación. El cloruro de cinc produce úlceras cutáneas. Varios compuestos de cinc presentan riesgo de incendio y de explosión. La fabricación electrolítica de cinc puede producir nieblas que contengan ácido sulfúrico y sulfato de cinc que pueden irritar el aparato respiratorio y digestivo produciendo erosión dental. En la metalurgia y en la producción de cinc, las operaciones de soldadura y corte de metales galvanizados o cincados, o las operaciones de fundición y soldadura del latón o el bronce, el riesgo más frecuente derivado del cinc y sus compuestos es la exposición a los humos de óxido de cinc, el cual puede causar la fiebre de los humos metálicos. Los síntomas de este trastorno son: ataques de escalofríos, fiebre irregular, sudoración profusa, náuseas, sed, cefalea, dolores en las extremidades y sensación de extremo cansancio. Las crisis son de corta duración (en la mayoría de los casos, se observa una recuperación completa en las 24 horas siguientes a la aparición de los síntomas), y parece que se desarrolla tolerancia. En los trabajadores que participan en las tareas de envasado de óxido de cinc se han descrito aumentos de la protoporfirina eritrocítica libre. Los humos de cloruro de cinc son irritantes para los ojos y las mucosas. El fosfuro de cinc, que se utiliza como rodenticida, es tóxico para el hombre tanto por vía oral, como inhalado o inyectado y, es con el cloruro de cinc, la más peligrosa de las sales de cinc.

La presencia de cromato de cinc en las pinturas de imprimación utilizadas por los carroceros de automóviles, los hojalateros y los fabricantes de muebles metálicos se ha asociado con la aparición de ulceraciones nasales y dermatitis

en los trabajadores expuestos [34]. El cloruro de cinc tiene un efecto cáustico que puede producir ulceraciones en los dedos, manos y antebrazos de las personas que manipulan maderas impregnadas con esta sustancia o que la utilizan como fundente en operaciones de soldadura. Se ha descrito que el polvo de óxido de cinc puede bloquear los conductos de las glándulas sebáceas y provocar un eczema pustuloso en los trabajadores encargados del envasado de este compuesto [35].

### 3.3. Cobalto

**Distribución y usos:** El cobalto es un metal blanco azulado, muy duro y dotado de propiedades magnéticas. Los principales minerales son arseniuros, sulfuros y óxidos. El cobalto es uno de los alérgenos más frecuentes después del níquel. Es considerado como un contaminante del níquel por lo que ambas sensibilidades pueden presentarse juntas. Además de las aleaciones en la que el cobalto es sintéticamente combinado con el cromo y el níquel, también se encuentra en asociación con estos metales en la naturaleza. En los seres humanos es frecuente encontrar "cosensibilidad" con el cromo, siendo observada la sensibilidad mixta al cobalto-níquel más habitualmente en mujeres. Es excepcional observar reacciones epicutáneas positivas sólo al cobalto. Las sales que más sensibilizan son el cloruro y el nitrato que además han sido identificados como fotosensibilizantes. El sulfato y otras sales menos comunes son menos sensibilizantes.

Las fuentes de exposición y sus usos son muy numerosas en el medio laboral. Se utiliza para producir aleaciones resistentes, en la industria del cemento y la construcción, en la fabricación de detergentes y productos de limpieza, en la industria de metales duros: perforadoras, máquinas para cortar y extractoras, prensadoras, trituradoras, en la industria de las resinas de poliéster y del caucho (acelerante), en la industria del acabado de mármol, en la industria de carburos metálicos, en peluquería (utensilios metálicos, tintes de pelo), en la fabricación de pigmentos y secantes en lacas, barnices, pinturas, tinta para imprentas, pigmentos y esmaltes utilizados en la alfarería, cerámica, vidriocrystal, pinturas, artes gráficas, en joyería, en la fabricación y manipulación de alimentos, en la industria cosmética, etc. Además, forma parte de los componentes metálicos de vestidos y calzados, se utiliza en la

industria del galvanizado y de pieles, como estabilizador de la espuma de cerveza, conservador de madera, y es un componente de los líquidos limpiadores de lentes de contacto.

**Riesgos y toxicidad:** El cobalto se utiliza como aditivo en algunos alimentos, cerveza, Vitamina B12 por lo que puede sensibilizar por administración sistémica del mismo en pacientes previamente sensibilizados. El cloruro de cobalto puede producir urticaria de contacto, hecho común por el empleo de rimmel azul. Es frecuente la asociación de reacciones concomitantes, mal llamadas cruzadas, entre el cobalto, el cromo y el níquel, pero la incidencia de dermatitis únicamente debidas a las sales de cobalto es mucho menor. El cobalto puede determinarse en la orina. El valor normal de cobalto en orina es menor de 2 µg/g de creatinina. La concentración máxima permisible es 15 µg/L. El control biológico puede certificar la relación causa-efecto, pero el diagnóstico de sensibilización lo darán únicamente las pruebas epicutáneas.

En seres humanos y mamíferos los efectos característicos de la sobredosis de cobalto son la disminución de la actividad de la glándula tiroidea, pudiendo favorecer la formación de bocio. En la sangre, aumenta la cantidad de eritrocitos (policitemia), los vasos sanguíneos se dilatan temporalmente y disminuye la capacidad de coagulación de la sangre. A todas estas manifestaciones se suman con frecuencia trastornos del sistema nervioso. Pueden producirse lesiones cardíacas y fibrosis pulmonar (crónica) [36]. El problema más significativo desde el punto de vista toxicológico es la inhalación de polvo de cobalto (efecto carcinógeno comprobado) y el riesgo de sensibilización. La inhalación de polvo de cobalto produce, además, efectos cáusticos en la garganta y el tracto gastrointestinal. La intoxicación desencadena disfunciones hepáticas y renales [37].

### 3.4. Cobre

**Distribución y usos:** El cobre es maleable y dúctil, un excelente conductor del calor y la electricidad, y su capacidad funcional se altera muy poco con la exposición al aire seco. Si se encuentra en una atmósfera húmeda con anhídrido carbónico, se cubre con una capa verde de carbonato. El cobre es un elemento esencial del metabolismo humano. El cobre se encuentra

principalmente en forma de compuestos minerales y está ampliamente distribuido en todos los continentes y forma parte de la mayoría de los organismos vivos. Aunque se han descubierto algunos depósitos naturales de cobre metálico, generalmente se extrae en forma de sulfuros, como es el caso de la coquelita ( $\text{CuS}$ ), la calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ), la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) y la bornita ( $\text{Cu}_3\text{FeS}_3$ ); o de óxidos, como la malaquita ( $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$ ); la crisocola ( $\text{CuSiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y la calcantita ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Debido a sus propiedades eléctricas, más del 75 % del cobre que se produce se utiliza en la industria eléctrica. Entre otros usos de este metal se encuentra la fabricación de cañerías para el agua, material para techumbres, baterías de cocina, equipos químicos y farmacéuticos y producción de aleaciones de cobre. El cobre metálico también se utiliza como pigmento y como precipitante del selenio. Las aleaciones no ferrosas más ampliamente utilizadas son las de cobre y cinc (latón), estaño (bronce), níquel (metal monel), aluminio, oro, plomo, cadmio, cromo, berilio, silicón o fósforo. El sulfato de cobre se utiliza como algicida y molusquicida en el agua; como fungicida vegetal, mezclado con cal; como mordente en galvanoplastia; como agente espumante para la separación por flotación del mineral de sulfuro de cinc; y como agente para el curtido del cuero y la conservación de pieles. El sulfato de cobre neutralizado con cal hidratada, conocido como mezcla de Burdeos, se utiliza para la prevención del mildiu en viñedos. El óxido cúprico se ha utilizado como componente de las pinturas para los fondos de las embarcaciones y como pigmento para vidrio, cerámica, esmaltes, vitrificado de porcelanas y gemas artificiales. También se utiliza en la fabricación de rayón y otros compuestos de cobre, como agente para el pulido de cristales ópticos y como disolvente para los minerales de cromo y hierro. El óxido cúprico se utiliza como componente del fundente en la metalurgia del cobre, en los compuestos pirotécnicos, en los fundentes para la soldadura del bronce y en productos agrícolas, como insecticidas y fungicidas. El óxido cúprico negro se utiliza para corregir las deficiencias de cobre en el suelo y como complemento de piensos. Los cromatos de cobre son pigmentos, catalizadores para la hidrogenación en fase líquida y fungicidas para las patatas. Una solución de hidróxido cúprico con un exceso de amoníaco se utiliza como disolvente de la celulosa en la fabricación del rayón (viscosa). El hidróxido cúprico se utiliza en la fabricación de los electrodos de baterías y

para el tratamiento y la coloración del papel. También se utiliza como pigmento, aditivo para piensos, mordente para teñir textiles y como componente de fungicidas e insecticidas.

**Riesgos y toxicidad:** Los complejos aminados de clorato cúprico, ditionato cúprico, azida cúprica y acetiluros cuprosos son explosivos, pero no son importantes desde el punto de vista industrial o sanitario. El acetiluro de cobre ha sido causa de explosiones en las fábricas de acetileno, por lo que se ha eliminado el uso del cobre en la construcción de dichas plantas. Fragmentos de cobre metálico o de aleaciones de cobre pueden alojarse en los ojos, produciendo lo que se conoce como chalcosis lo cual puede dar lugar a la pérdida de los ojos. Los trabajadores que fumigan los viñedos con la mezcla de Burdeos pueden padecer lesiones pulmonares (conocidas como "pulmón de fumigador de viñedos") y granulomas hepáticos cargados de cobre. La ingestión accidental de sales de cobre solubles es generalmente inocua, ya que la inducción al vómito libera al paciente de gran parte del cobre.

A pesar de que en los trabajos químicos de referencia se indica que las sales de cobre son tóxicas, en la práctica esto sólo es cierto cuando las disoluciones se utilizan de forma incontrolada, con fines suicidas o como tratamiento tópico de áreas con quemaduras graves. Cuando se ingiere sulfato de cobre, también conocido como piedra azul o azul vitriolo, en cantidades del orden de gramos, se producen náuseas, vómitos, diarrea, sudoración, hemólisis intravascular y posible fallo renal; en raras ocasiones se producen también convulsiones, coma y la muerte. Cuando se beben aguas carbonatadas o zumos de cítricos que han estado en contacto con recipientes, cañerías, grifos o válvulas de cobre se puede producir irritación del tracto gastrointestinal que pocas veces llega a ser grave. Este tipo de bebidas son suficientemente ácidas para disolver niveles de cobre irritantes.

La inhalación de polvos, humos o nieblas de sales de cobre puede causar congestión nasal y de las mucosas, y ulceración con perforación del tabique nasal. Los humos desprendidos durante el calentamiento del cobre metálico pueden producir fiebre, náuseas, gastralgias y diarrea [38].

Efectos tóxicos crónicos atribuibles al cobre sólo parecen existir en personas que han heredado una pareja específica de genes recesivos autosómicos y que, como consecuencia, desarrollan una degeneración

hepatolenticular (enfermedad de Wilson). El contenido corporal de cobre en una persona adulta es de 100 a 150 mg y es casi constante. En individuos normales (sin enfermedad de Wilson), casi todo el cobre está presente como parte integrante y funcional de una docena de proteínas y sistemas enzimáticos, como la citocromo oxidasa, la dopa-oxidasa y la ceruloplasmina sérica. En personas que ingieren grandes cantidades de ostras o mariscos de concha, hígado, setas, nueces y chocolate, alimentos todos ellos ricos en cobre, o en mineros que trabajan y comen durante 20 años o más en un ambiente cargado con un 1 ó 2 % de polvo de minerales de cobre, pueden llegar a observarse concentraciones hasta 10 veces superiores a lo normal [39].

### 3.5. Cromo

Distribución y usos: El cromo elemental no se encuentra como tal en la naturaleza; el único mineral de cromo importante es la espinela, cromita o piedra de cromo-hierro, que es cromito ferroso ( $\text{FeOCr}_2\text{O}_3$ ) y está ampliamente distribuida en la corteza terrestre. Además de ácido crómico, este mineral contiene cantidades variables de otras sustancias. Comercialmente, sólo se emplean los minerales o concentrados que contienen más del 40 % de óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ). La cromita puede obtenerse de minas subterráneas o a cielo abierto. La aplicación más importante del cromo puro es el cromado de una gran variedad de equipos, como piezas de automóvil y equipos eléctricos. También es ampliamente utilizado en aleaciones con hierro y níquel para formar acero inoxidable, y con níquel, titanio, niobio, cobalto, cobre y otros metales para formar aleaciones con fines específicos.

El cromo forma diversos compuestos en distintos estados de oxidación. Los más importantes son los estados de valencia II (cromosos), III (crómicos) y VI (cromatos). El estado II es básico, el III es anfótero y el VI es ácido. En las aplicaciones comerciales se utilizan principalmente compuestos de cromo en estado VI y, en algunos casos, en estado III. El estado cromoso ( $\text{Cr(II)}$ ) es inestable y se oxida rápidamente al estado crómico ( $\text{Cr(III)}$ ). Los compuestos crómicos son muy estables y forman muchos otros compuestos con aplicaciones comerciales; los principales son: el óxido crómico y el sulfato básico de cromo. El cromo en estado de oxidación +6 ( $\text{Cr(VI)}$ ) es el de mayor

aplicación industrial por sus propiedades ácidas y oxidantes y su capacidad para formar sales muy coloreadas e insolubles. Los compuestos hexavalentes de cromo (Cr(VI)) más importantes son: el dicromato sódico, el dicromato potásico y el trióxido de cromo. La mayoría de los demás compuestos de cromatos se producen industrialmente utilizando dicromato como fuente de Cr(VI).

Los compuestos que contienen Cr(VI) se utilizan en muchos procesos industriales, entre los que cabe destacar: la fabricación de importantes pigmentos inorgánicos como los cromatos de plomo (también utilizados para preparar verdes de cromo), los naranjas de molibdato, el cromato de cinc y el verde de óxido crómico; la conservación de la madera; la fabricación de anticorrosivos; y la fabricación de vidrios y esmaltes de color.

Los sulfatos crómicos básicos se utilizan ampliamente en los procesos de curtido. Otros usos conocidos de los compuestos químicos de cromo son la estampación de telas, la preparación de numerosos catalizadores importantes que contienen óxido crómico y la producción de coloides dicromados sensibles a la luz para litografías. El ácido crómico se utiliza no sólo para el cromado “decorativo”, sino también para el “duro”, con capas mucho más gruesas para obtener una superficie sumamente resistente con un bajo coeficiente de fricción. De la potente acción oxidante de los cromatos en disolución ácida se derivan muchas aplicaciones industriales, especialmente con materiales orgánicos, como la oxidación del trinitrotolueno (TNT) para producir fluoroglucinol y la oxidación de la picolina para obtener ácido nicotínico. El óxido de cromo se utiliza también para producir cromo metálico puro adecuado para su incorporación en aleaciones de alta temperatura resistentes al arrastre y como óxido refractario.

El cromo puede formar parte del recubrimiento de la pieza que se tiene que soldar, sobre todo si es de acero inoxidable y de los electrodos (electrodos de aleación de cromo). Los humos de soldadura pueden contener Cr(VI), Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Cr(III)), u óxidos dobles, tales como FeO Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, o ambos.

**Riesgos y toxicidad:** Los compuestos de Cr(III) son considerablemente menos peligrosos que los compuestos de Cr(VI) [40]. Los compuestos de Cr(III) no se absorben fácilmente en el aparato digestivo y pueden combinarse con proteínas de las capas superficiales de la piel, formando complejos



estables. En ausencia de una sensibilización previa con compuestos de Cr(VI), los compuestos de Cr(III) no producen ulceraciones ni suelen producir dermatitis alérgicas. Los compuestos de Cr(VI) se absorben rápidamente después de la ingestión o la inhalación. Los efectos irritantes y corrosivos del Cr(VI) se producen inmediatamente después de una absorción rápida a través de la mucosa [41]. La exposición profesional a los compuestos de Cr(VI) puede producir irritación o corrosión cutáneo-mucosa, reacciones cutáneas de tipo alérgico o ulceraciones de la piel. Los efectos nocivos de los compuestos de cromo se observan generalmente entre las personas que trabajan en lugares donde está presente el Cr(VI), especialmente durante su fabricación o utilización, y afectan principalmente a la piel y al aparato respiratorio. Los riesgos industriales típicos son: la inhalación de polvo y humos procedentes de la fabricación del dicromato a partir del mineral de cromita y de la fabricación de los cromatos de plomo y cinc; la inhalación de nieblas de ácido crómico durante el cromado o el revestimiento de superficies metálicas; y el contacto cutáneo con compuestos de Cr(VI) durante su fabricación o uso. La exposición a humos que contienen Cr(VI) también puede producirse durante la soldadura del acero inoxidable. Las úlceras por cromo son lesiones bastante frecuentes como resultado de la exposición profesional a los compuestos de Cr(VI). Los compuestos de Cr(VI) ocasionan tanto irritación cutánea primaria como sensibilización. Se ha demostrado que el Cr(VI) penetra en la piel a través de las glándulas sudoríparas, reduciéndose a Cr(III) en el corion.

La inhalación de polvo o nieblas que contengan Cr(VI) produce irritación de las mucosas. A concentraciones elevadas, la aparición de estornudos, rinorrea, lesiones del tabique nasal y enrojecimiento de la garganta son efectos bien documentados. Se ha observado asimismo tos, cefalea, disnea y dolor retroesternal tras una exposición durante varios días a una niebla de ácido crómico en concentraciones de aproximadamente 20 a 30 mg/m<sup>3</sup>. La ulceración del tabique nasal es resultado del depósito de partículas con Cr(VI) o pequeñas gotas de niebla en el tabique nasal, que producían úlceras en la parte cartilaginosa, seguidas en muchos casos de la perforación en el lugar de la úlcera. Se ha descrito necrosis renal y hepática [42]. También se han comprobado los efectos cancerígenos del Cr(VI). Así, los cromatos de cinc y calcio parecen ser los más cancerígenos y se cuentan entre los cancerígenos

más potentes en humanos [43]. También se ha descrito una mayor incidencia de cáncer de pulmón en personas expuestas a cromatos de plomo y a humos de trióxidos de cromo. No existe un nivel de exposición “seguro” claramente establecido. Sin embargo, la mayoría de los informes ponen de manifiesto una asociación entre la exposición al Cr(VI) y el cáncer de los órganos respiratorios en exposiciones a niveles en el aire superiores a 50 mg Cr(VI)/m<sup>3</sup> aire.

### 3.6. Hierro

Distribución y usos: El hierro es el segundo metal más abundante y el cuarto de todos los elementos, superado únicamente por el oxígeno, el silicio y el aluminio. Los minerales de hierro más comunes son: la hematita o mineral de hierro rojo (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), que contiene un 70 % de hierro; la limonita o mineral de hierro marrón (FeO(OH)·nH<sub>2</sub>O), con un 42 % de hierro; la magnetita o mineral de hierro magnético (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), con un alto contenido de hierro; la siderita o mineral de hierro espático (FeCO<sub>3</sub>); la pirita (FeS<sub>2</sub>), el mineral azufrado más común; y la pirrotita o pirita magnética (FeS). El hierro se utiliza para la fabricación de piezas de hierro y acero fundidos y en aleaciones con otros metales. También se emplea para aumentar la densidad de los líquidos en las perforaciones petrolíferas.

El hierro por sí mismo no es especialmente fuerte, pero su resistencia aumenta de forma notable cuando se alea con carbono y se enfría rápidamente para formar acero, lo que explica su importancia como metal industrial. Unos 20 elementos más, con cualidades muy distintas de dureza, ductilidad, resistencia a la corrosión, etc., se utilizan en diversas combinaciones y proporciones en la producción de aleaciones de acero. Los más importantes son el manganeso (ferromanganeso y spiegeleisen), el silicio (ferrosilicio) y el cromo. Desde el punto de vista industrial, los compuestos de hierro más importantes son los óxidos y el carbonato, los cuales constituyen los minerales más importantes de los que se obtiene el metal.

Riesgos y toxicidad: Existen riesgos industriales durante la extracción, el transporte y la preparación de los minerales, durante la producción y el uso del metal y sus aleaciones en las fábricas de hierro y acero, en las fundiciones, y durante la fabricación y el uso de ciertos compuestos. La inhalación de polvo o humos de hierro puede producirse en la minería del hierro, en la soldadura

con arco eléctrico, el triturado, el abrillantado y el trabajo del hierro y en el rascado de calderas. Si se inhala, el hierro es un irritante local para los pulmones y el tracto gastrointestinal. Los estudios realizados indican que la exposición prolongada a una mezcla de polvo de hierro y otros metales puede afectar a la función pulmonar. La inhalación de polvo que contenga óxido de hierro o sílice puede originar neumoconiosis, pero no existen conclusiones definitivas con relación al papel de las partículas de óxido de hierro en el desarrollo del cáncer de pulmón en el hombre. La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado la fundición del hierro y el acero como un proceso cancerígeno para los seres humanos. Los resultados en los soldadores son contradictorios. Sin embargo, en los estudios experimentales realizados hasta la fecha no se ha demostrado que el óxido férrico sea cancerígeno [44].

El polvo de hierro fino recién producido es pirofórico y se inflama al exponerse al aire a temperaturas normales. Las propiedades peligrosas asociadas a los demás compuestos del hierro se deben por lo general al radical con que está asociado el hierro. Así, el arsenato ( $\text{FeAsO}_4$ ) y el arsenito férricos ( $\text{FeAsO}_3 \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ ) poseen las propiedades venenosas de los compuestos arsenicales. El hierro carbonilo ( $\text{FeCO}_5$ ) es uno de los carbonilos metálicos más peligrosos, con propiedades tóxicas e inflamables. El sulfuro ferroso ( $\text{FeS}$ ), además de su presentación natural como pirita, se produce de forma no intencionada cuando se tratan materiales que contienen azufre en recipientes de hierro y acero, como por ejemplo en las refinerías de petróleo. Si el depósito de sulfuro de hierro se expone al aire, su oxidación exotérmica puede elevar la temperatura del depósito a la temperatura de inflamación de los gases. En las minas de pirita pueden encontrarse problemas similares cuando la temperatura del aire aumenta debido a la oxidación lenta y continua del mineral [45].

### 3.7. Manganeseo

Distribución y usos: El manganeseo es uno de los elementos más abundantes de la corteza terrestre. Se encuentra en la tierra, los sedimentos, las rocas, el agua y los productos biológicos. Al menos un centenar de minerales contienen manganeseo. Entre los minerales que contienen

manganeso, los óxidos, carbonatos y silicatos son las formas más importantes. El manganeso puede presentarse en ocho estados de oxidación diferentes, de los que los más importantes son: +2, +3 y +7. El dióxido de manganeso ( $\text{MnO}_2$ ) es el óxido más estable. El manganeso forma diversos compuestos organometálicos. El de mayor interés práctico es el metilciclopentadienil manganeso tricarbonilo  $\text{CH}_3\text{C}_5\text{H}_4\text{Mn}(\text{CO})_3$ , que suele denominarse MMT. La fuente comercial más importante de manganeso es el dióxido de manganeso ( $\text{MnO}_2$ ), que se encuentra naturalmente en depósitos sedimentarios de pirolusita. También existen otros dos tipos de depósitos: las acumulaciones de carbonatos que suelen estar compuestas por rodocrosita ( $\text{MnCO}_3$ ), y los depósitos estratiformes. El manganeso se utiliza en la producción del acero como reactivo para reducir el oxígeno y el azufre, y como agente de aleación para la fabricación de aceros especiales, aluminio y cobre. En la industria química se utiliza como reactivo oxidante y para la producción de permanganato de potasio y otros productos químicos derivados del manganeso. Además, se utiliza como recubrimiento de electrodos en varillas de soldadura, en los trituradores de rocas y en las agujas y cambios de vía de los ferrocarriles. También se emplea en la fabricación de cerámica, cerillas, vidrio y tintes. Algunas sales de manganeso se utilizan como fertilizantes y como secantes para el aceite de linaza, en la fabricación de vidrio, como decolorantes de textiles y en el curtido de pieles.

**Riesgos y toxicidad:** En el ámbito laboral, el manganeso se absorbe principalmente por inhalación. El dióxido de manganeso y otros compuestos de manganeso utilizados o producidos como subproductos volátiles del proceso de refinado del metal son prácticamente insolubles en agua. Por este motivo, sólo llegan al torrente sanguíneo las partículas suficientemente pequeñas para alcanzar el alvéolo pulmonar [46]. Las partículas de mayor tamaño inhaladas pueden ser depuradas por las vías respiratorias y deglutidas. El manganeso también puede llegar al aparato digestivo a través de los alimentos o del agua contaminada. En la velocidad de absorción puede influir el nivel de manganeso y hierro contenido en la dieta, el tipo de compuesto de manganeso, la edad y las deficiencias de hierro. Sin embargo, el riesgo de intoxicación por esta vía no es grande. La absorción de manganeso a través de la piel puede considerarse despreciable. Tras su inhalación o tras administración parenteral

u oral, el manganeso absorbido se elimina rápidamente de la sangre y se distribuye principalmente en el hígado. El exceso de metal se puede distribuir en otros tejidos, como los riñones, el intestino delgado, las glándulas endocrinas y los huesos. En la sangre, el manganeso se encuentra unido a las proteínas [47]. La bilis constituye la principal vía de excreción del manganeso, por lo que se elimina casi completamente en las heces; sólo entre un 0,1 y un 1,3 % de la ingesta diaria se elimina por vía urinaria. El manganeso, como parte de una metaloproteína de algunos complejos enzimáticos es un elemento esencial para el ser humano.

Los trabajos de minería presentan el mayor riesgo profesional, seguido en importancia por la industria del ferromanganeso. Las operaciones que producen las mayores concentraciones de polvo de dióxido de manganeso son las de triturado y pega de barrenos. La toxicidad de los distintos compuestos de manganeso parece depender del tipo de ión manganeso y de su estado de oxidación [48-51]. Cuanto menos oxidado esté el compuesto, mayor será su toxicidad. La intoxicación crónica por manganeso puede tener manifestaciones nerviosas o pulmonares [52].

### 3.8. Níquel

Distribución y usos: El níquel es un metal duro, dúctil, maleable, resistente a la corrosión de color blanco-plateado con propiedades físicas y químicas que lo hacen muy deseable para combinarlo con otros metales para formar mezclas llamadas aleaciones. Algunos de los metales con los que el níquel puede alearse son hierro, cobre, cromo y cinc. Estas aleaciones se usan en joyería, monedas y en todo tipo de industria. Aunque la mayor parte del níquel se usa en la fabricación de acero inoxidable. El níquel se presenta principalmente en los aceros inoxidables y su óxido puede causar fiebre metálica. El papel fisiológico del níquel en animales y humanos todavía no se ha determinado. Se cree, teniendo como base los estudios realizados en plantas y microorganismos que el níquel puede actuar como cofactor de metaloenzimas/proteínas o como cofactor que facilita la absorción del hierro en el intestino. El níquel también puede actuar en la función endocrina regulando los niveles de prolactina [53-54].

Riesgos y toxicidad: Los riesgos para el hombre derivados de la exposición profesional a los compuestos de níquel pueden dividirse en tres categorías principales:

1. alergias
2. rinitis, sinusitis y enfermedades respiratorias
3. cánceres de las cavidades nasales, de pulmón y de otros órganos

La exposición ocupacional por níquel hace que la concentración de este metal en los trabajadores expuestos sea mucho mayor que la de la población en general. La exposición al níquel y sus compuestos en el lugar de trabajo se produce esencialmente por inhalación y contacto con la piel. La inhalación de aerosoles de sales de níquel ha causado asma en casos de exposición de corta duración mientras que una exposición crónica puede provocar una irritación de las membranas mucosas nasales y una perforación del tabique nasal. También se ha considerado que existía una relación entre la exposición crónica a determinados compuestos del níquel y carcinomas de los pulmones y de las vías nasales [55-62].

Después de ser inhalado, el níquel se puede depositar en los pulmones dependiendo del tamaño de las partículas inhaladas. Las partículas mayores (5-30  $\mu\text{g}$ ) tienden a acumularse en la zona superior del tracto respiratorio, mientras que las partículas más pequeñas se depositan en la zona inferior del sistema respiratorio. La absorción en la corriente sanguínea de las partículas depositadas en los pulmones depende de la forma en la que se encuentra el níquel y de la solubilidad del compuesto que esté formando. Así, los compuestos solubles de níquel tales como cloruro de níquel y sulfato de níquel se absorben muy fácilmente (casi al 100%), mientras que casi ninguno de los compuestos menos solubles de níquel tales como el óxido de níquel o el sulfuro de níquel es absorbido, lo cual se demuestra por los niveles urinarios de níquel en trabajadores expuestos. El níquel inhalado que es absorbido es excretado por la orina. Estudios realizados demuestran que la orina de los trabajadores expuestos a níquel presenta un incremento en la concentración al final de la jornada laboral, siendo más marcado este incremento al final de la semana laboral, lo cual indica que una fracción del níquel se elimina bastante rápido, pero hay otra que se elimina más lentamente. Aquellos trabajadores

expuestos a formas insolubles de níquel presentan altos niveles de níquel en la mucosa nasal, mientras que los que están expuestos a formas solubles de níquel presentan altos niveles de este metal en el suero sanguíneo. La exposición pulmonar a óxido de níquel estudiada en ratas reflejó que la excreción del óxido de níquel se realizaba por heces, pero no por orina debido a que el mecanismo de eliminación primario del óxido de níquel se produce desde los pulmones y no por mecanismos de disolución-absorción [62-65].

### 3.9. Plomo

**Distribución y usos:** El mineral más rico en plomo es la galena (sulfuro de plomo) y constituye la fuente principal de producción comercial de este metal. Otros minerales de plomo son: la cerusita (carbonato), la anglesita (sulfato), la corcoita (cromato), la wulfenita (molibdato), la piromorfita (fosfato), la mutlockita (cloruro) y la vanadinita (vanadato). En muchos casos, los minerales de plomo pueden contener otros metales tóxicos. El plomo metálico se utiliza en forma de planchas o tubos cuando se requiere una gran maleabilidad y resistencia a la corrosión, como en la industria química o en la construcción. También se utiliza para el revestimiento de cables, como componente de soldadura y como empaste en la industria automovilística. Es un material excelente como protector de radiaciones ionizantes. Se utiliza en los procesos de metalizado para proporcionar recubrimientos protectores, en la fabricación de acumuladores y como baño de termotratamiento en el revenido de hilos metálicos. El plomo se encuentra en una gran variedad de aleaciones y sus compuestos se preparan y utilizan en grandes cantidades en numerosas industrias. Los óxidos de plomo se utilizan en las placas de las baterías eléctricas y los acumuladores ( $\text{PbO}$  y  $\text{Pb}_3\text{O}_4$ ), como agentes de mezcla en la fabricación de caucho ( $\text{PbO}$ ) y en la fabricación de pinturas ( $\text{Pb}_3\text{O}_4$ ) y como componentes de barnices, esmaltes y vidrio. Las sales de plomo constituyen la base de muchas pinturas y pigmentos: el carbonato y el sulfato de plomo se utilizan como pigmentos blancos y los cromatos de plomo sirven para obtener amarillo, naranja, rojo y verde de cromo. El arseniato de plomo es un insecticida; el sulfato de plomo se utiliza en mezclas de caucho; el acetato de plomo tiene usos importantes en la industria química; el naftenato de plomo es un agente secante muy utilizado y el plomo tetraetilo se utiliza

como agente antidetonante para la gasolina en aquellos países en que la legislación aún lo permite.

**Riesgos y toxicidad:** El principal riesgo del plomo es su toxicidad. La intoxicación por plomo ha sido siempre una de las enfermedades profesionales más importantes. Son muchas las profesiones en las que puede tener lugar una exposición al plomo. En la minería del plomo se produce una absorción considerable de este elemento a través del aparato digestivo; en consecuencia, el grado de riesgo en esta industria depende, en parte, de la solubilidad de los minerales que se manipulen. El sulfuro de plomo (PbS) en la galena es insoluble y su absorción por vía pulmonar es limitada; sin embargo, en el estómago, parte del sulfuro de plomo puede convertirse en cloruro de plomo ligeramente soluble y llegar a absorberse en cantidades moderadas. En las fundiciones de plomo, los riesgos principales son los derivados del polvo de plomo que se produce durante las operaciones de triturado y molienda en seco, y los humos y óxidos de plomo que se liberan durante la sinterización, la reducción en hornos altos y el refinado. Si el plomo se trabaja a temperaturas inferiores a 500 °C, como ocurre en las operaciones de soldadura, el riesgo de exposición a humos es mucho menor que en la soldadura con plomo, en que la llama alcanza temperaturas más elevadas. El recubrimiento por rociado de metales con plomo fundido es muy peligroso, pues genera polvo y humos a temperaturas elevadas. La demolición de estructuras de acero pintadas con pinturas fabricadas a base de plomo, como puentes y barcos, produce con frecuencia casos de intoxicación por plomo.

En la industria, la principal vía de entrada es el aparato respiratorio. Puede absorberse cierta cantidad por las vías aéreas superiores, pero la proporción mayor se absorbe a través de la circulación pulmonar. A pesar de que el aparato respiratorio es la vía principal de entrada, una mala higiene en el trabajo, el hábito de fumar durante el mismo (contaminación del tabaco o de las manos) y una mala higiene personal pueden aumentar considerablemente la exposición, sobre todo por vía oral.

En el organismo humano, el plomo inorgánico no se metaboliza, sino que se absorbe, se distribuye y se excreta directamente. La velocidad a que se absorbe el plomo depende de su forma química y física y de las características fisiológicas de la persona expuesta (edad y estado nutricional). Una vez en la



---

sangre, el plomo se distribuye en tres compartimentos: la sangre, los tejidos blandos (riñón, médula ósea, hígado y cerebro) y el tejido mineralizado (huesos y dientes) [66]. El plomo que no se retiene en la sangre se excreta a través de los riñones o del aclaramiento biliar al tracto gastrointestinal. Los efectos biológicos del plomo son los mismos independientemente de que entre en el organismo por inhalación o ingestión. El plomo interfiere con la función celular normal y con varios procesos fisiológicos. El destino más sensible de intoxicación por plomo es el sistema nervioso. También se ha observado una disminución en la agudeza auditiva, especialmente a altas frecuencias, al aumentar los niveles de plomo en sangre. Además, el plomo inhibe la capacidad del organismo para producir hemoglobina al interferir con varios pasos enzimáticos en la vía metabólica del grupo hemo. Existe una correlación inversa clara entre los niveles de plomo en sangre y los niveles de vitamina D. Dado que en el sistema endocrino la vitamina D es responsable en gran parte del mantenimiento de la homeostasis de calcio intra y extracelular es probable que el plomo impida el crecimiento y la maduración celular y el desarrollo de huesos y dientes. Un efecto directo de la exposición prolongada al plomo es la nefropatía [67-68]. La alteración de la función de los túbulos proximales se manifiesta como aminoaciduria, glicosuria e hiperfosfaturia. También existen pruebas de una asociación entre la exposición al plomo y la hipertensión, un efecto que puede estar mediado por mecanismos renales [69].

#### 4.- INDICADORES BIOLÓGICOS DE LA EXPOSICIÓN A METALES

La evaluación de la exposición a contaminantes en el medioambiente laboral se puede realizar tomando muestras de aire o de indicadores biológicos [70-71].

La relación de límites aceptables de exposición a contaminantes se basa en la suposición de que no hay riesgo estimable a niveles más bajos que estos límites para todas o casi todas las personas expuestas. Aunque la dosis diaria recomendada o la concentración admisible en medios ambientales o en la atmósfera del lugar de trabajo se ha utilizado y aceptado al nivel gubernamental en la mayoría de los países, se ha comprobado que diversos factores pueden afectar a la absorción de los contaminantes para una misma concentración de éstos en el aire. Estos factores son los siguientes: absorción adicional a través de la piel, diferente absorción de los contaminantes por parte de las personas, dependencia de la edad, de la carga de trabajo, y del uso y efectividad de los dispositivos de protección personal. Por estos motivos, se introdujo a mediados del S. XX el concepto de *indicador biológico de la exposición*. Este concepto se concibe a partir de la toxicología industrial como un método para estimar la exposición a compuestos tóxicos, y ha sido aceptado por científicos y organizaciones internacionales. Así, se han publicado índices biológicos de exposición en EEUU (Biological Exposure Indices (BEI)), en Alemania (Biologische Arbeitstoftoleranzwerte (BAT)) y en España los valores límite biológicos (VLB). Estos índices de exposición se aplican actualmente a la toxicología ambiental y ocupacional, así como también para realizar estudios epidemiológicos sobre la relación dosis-respuesta entre la exposición interna y los efectos adversos de la exposición a contaminantes químicos para la salud [72].

Los VLB son los valores de referencia para los Indicadores Biológicos asociados a la exposición global a los agentes químicos. Los VLB son aplicables para exposiciones profesionales de 8 horas diarias durante 5 días a la semana. La extensión de los VLB a períodos distintos al de referencia ha de hacerse considerando los datos farmacocinéticos y farmacodinámicos del agente en particular. En general, los VLB representan los niveles más probables de los Indicadores Biológicos en trabajadores sanos sometidos a una exposición

global a agentes químicos, equivalente, en términos de dosis absorbida, a una exposición exclusivamente por inhalación del orden del VLA-ED. Las bases científicas para establecer los VLB pueden derivarse de dos tipos de estudios: los que relacionan la intensidad de la exposición con el nivel de un parámetro biológico, y los que relacionan el nivel de un parámetro biológico con efectos sobre la salud. Los VLB no están concebidos para usarse como medida de los efectos adversos ni para el diagnóstico de las enfermedades profesionales. El control biológico debe considerarse complementario del control ambiental y, por tanto, ha de llevarse a cabo cuando ofrezca ventajas sobre el uso independiente de este último. El control biológico puede usarse para completar la valoración ambiental, para comprobar la eficacia de los equipos de protección individual o para detectar una posible absorción dérmica y/o gastrointestinal.

Como indicadores biológicos de la exposición a contaminantes se han utilizado fluidos biológicos (sangre y orina), pelo y otros tejidos. Aunque tradicionalmente han sido la sangre y la orina las muestras que se han analizado para efectuar la determinación de metales, la concentración de éstos en estos medios biológicos puede variar dependiendo de distintas condiciones fisiológicas o medioambientales. Sin embargo, el análisis de pelo puede proporcionar información fiable sobre los metales que se han acumulado en el cuerpo como resultado de la exposición a éstos en el medioambiente laboral, aunque hasta la fecha no se han establecido VLB para este indicador biológico [73].

En la Tabla V se muestra el valor de VLB para los metales para los que se dan valores en muestras de orina [27].

Tabla V.- VLBs de metales en muestras de orina

Agente Químico	VLB	Momento del Muestreo
Cd y productos inorgánicos	5 µg/g creatinina	No crítico
Cobalto y compuestos inorgánicos excepto óxidos	15 µg/L	Final de la semana laboral
Cr total	10 µg/L	Principio y final de la jornada laboral
	15 µg/L	Final de la jornada laboral

#### 4.1. La Orina como Indicador de la Exposición a Metales

Los indicadores biológicos medidos en orina son habitualmente analizados en muestras puntuales tomadas en momentos determinados, ya que en el entorno laboral no es fácil ni seguro obtener muestras de orina correspondientes a períodos largos de tiempo (por ejemplo 24 horas), las cuales proporcionarían una información más exacta sobre la eliminación del xenobiótico. Sin embargo, la medida cuantitativa de la exposición a partir de muestras puntuales puede verse afectada por la variabilidad en la producción de orina, debido a factores como la ingestión de líquidos, la temperatura excesiva, la carga de trabajo, el consumo de medicamentos, etc. que pueden producir efectos de concentración o dilución de la orina, y afectar así al resultado de los indicadores. Por esta razón es necesario corregir estos resultados, refiriéndolos a la concentración de alguna sustancia con mecanismo de excreción renal similar al del compuesto de interés y cuya eliminación se mantenga razonablemente constante a lo largo del tiempo (creatinina).

En este medio se encuentran los xenobióticos y/o sus productos de excreción que sean solubles en agua. El muestreo es muy sencillo, no requiere de procedimientos invasivos ni de personal especializado. Como la orina es una disolución acuosa homogénea es muy fácil estimar la recuperación del analito que se quiere determinar [74].

Los intervalos de concentración para varios elementos en muestras de orina de personas no directamente expuestas a humos metálicos son los que se muestran en la Tabla VI [75].

Tabla VI.- Intervalos de concentración para varios elementos en muestras de orina de personas no directamente expuestas a humos metálicos

Elemento	Concentración	Elemento	Concentración
Ag	0,04-6 µg/L	Fe	~ 0,17 mg/L
Al	2,3-110 µg/L	Hg	0,1-24 µg/L
As	2,3-100 µg/L	Mg	~ 90 mg/L
Ca	120 mg/L	Mn	0,12-20 µg/L
Cd	0,4-70 µg/L	Ni	0,06-8 µg/L
Co	0,2-135 µg/L	Pb	12-30 µg/L
Cr	0,04-50 µg/L	Sn	~ 14 µg/L
Cu	42-50 µg/L	Zn	0,27-0,85 mg/L

#### 4.2. El Pelo como Indicador de la Exposición a Metales

La mayoría de los compuestos que se incorporan al cabello son los que tienen afinidad por los grupos sulfhidrilo de la queratina. El pelo ha sido utilizado ampliamente como indicador de la exposición de metales en el medioambiente laboral [76]. Además de las ventajas expuestas anteriormente, está comprobado que los niveles de concentración de los metales en sangre u orina son relativamente bajos, lo que provoca que surjan problemas de sensibilidad al emplear técnicas analíticas convencionales.

Los intervalos de concentración para varios elementos en muestras de pelo de personas no directamente expuestas a humos metálicos son los que se muestran en la Tabla VII [75].

Tabla VII.- Intervalos de concentración para varios elementos en muestras de pelo de personas no directamente expuestas a humos metálicos

Elemento	Concentración	Elemento	Concentración
Ag	0,16-0,7 µg/g	Mg	1,49-567 µg/g
Al	0,1-36 µg/g	Mn	0,04-24 µg/g
As	0,03-25 µg/g	Na	0,02-2,02 mg/g
Ca	0,17-4,69 mg/g	Ni	0,002-4,05 µg/g
Cd	0,04-5,3 µg/g	Pb	0,004-95 µg/g
Co	0,07-1,7 µg/g	Pd	< 0,02 µg/g
Cr	0,08-2,50 µg/g	Rb	0,06-5,34 µg/g
Cu	6,0-293 µg/g	S	773 µg/g
Fe	10-900 µg/g	Zn	53,7-327 µg/g

El pelo es un vehículo principal de excreción de metales tóxicos, encontrándose estos metales en concentraciones unas diez veces superiores a las que se encuentran en sangre u orina.

La toma de muestra de pelo es accesible y sencilla, estas muestras son fáciles de tratar y se puede almacenar sin que se deteriore. El pelo absorbe los minerales tóxicos a través de sus raíces del torrente sanguíneo. La sustancia permanece conforme crece el pelo. Una longitud de pelo de 7,5 cm de la porción más cerca al cuero cabelludo ofrece una historia de 6 meses [76].

El principal problema que se tiene con el muestreo del cabello es la contaminación proveniente de fuentes externas como partículas suspendidas

en el aire, contaminantes presentes en el agua, productos de limpieza y cosméticos [77].

#### 4.3. La sangre como Indicador de la Exposición a Metales

En cuanto a los indicadores biológicos medidos en sangre, mientras no se indique lo contrario, se entenderá que la muestra debe ser tomada en sangre venosa. La sangre se supone que está en equilibrio con todos los órganos del cuerpo y, por lo tanto, es el medio que mejor refleja la exposición de los diferentes órganos en un momento dado. El factor que más afecta la representatividad de los resultados del muestreo de sangre es la distribución del tóxico entre el plasma y las células que puede variar con el periodo de exposición y el lapso transcurrido desde que sucedió. La distribución depende de las propiedades fisicoquímicas del compuesto. Los liposolubles normalmente se encuentran en las células y los compuestos ionizados en el plasma. En cada uno de estos compartimentos el compuesto se puede encontrar libre o asociado a diferentes ligandos como proteínas, cloruros, glutatión [78-79].

El muestreo de sangre requiere de entrenamiento especializado y se deben de tener los siguientes cuidados:

- no contaminar la muestra con la aguja o con el recipiente
- seleccionar procedimientos de muestreo y preparación que no afecten los resultados. Por ejemplo, si se usa AEDT como anticoagulante no se podrá hacer la determinación del nivel de plomo plasmático. La concentración de plomo que se determine en una muestra preparada en esta forma será un valor más alto que el real, debido a que el AEDT redistribuye el ión al provocar su emigración de las células al plasma.

#### 4.4. Otros Medios

Se pueden seleccionar otros medios biológicos para tomar muestras, tales como, aire exhalado (determinación de alcohol etílico), células exfoliadas de la piel, uñas, sudor, saliva, hueso y leche materna. El análisis de leche materna se utiliza principalmente para estimar exposiciones de infantes, y no para estimar concentraciones corporales en la madre [80-81].

## 5.- DETERMINACIÓN DE METALES EN EL AIRE DEL LUGAR DE TRABAJO: HUMOS DE SOLDADURA

### 5.1.- Toma de Muestra de Aire

La determinación del contaminante y su concentración se puede llevar a cabo, de una forma directa en el lugar de trabajo o bien a través de una toma de muestra, que se basa en la captación de los contaminantes sobre un soporte para su posterior análisis en el laboratorio. La toma de muestras puede realizarse de dos maneras:

- Toma de muestras estáticas o ambientales: sirve para determinar la concentración de contaminantes en zonas de trabajo definidas o que representen el ambiente general.
- Toma de muestras personales: sirve para dar una idea precisa de la exposición real de los trabajadores a los contaminantes. El muestreo personal a su vez se puede realizar de dos formas: zonal (en una sola zona, se recogen distintas muestras según el área o la zona de trabajo, de esta manera se puede estimar mejor dónde existe peligro higiénico, identificar los focos, y después poner en marcha las medidas correctoras oportunas) o permanente (para distintas zonas, el trabajador lleva el aparato de muestreo fijo, sin importar las zonas por las que transita).

El método de toma de muestra de los contaminantes químicos en el medio ambiente laboral depende del tipo de contaminante que se desea muestrear. A continuación se muestran los distintos métodos de toma de muestras de los contaminantes químicos:

GASES Y VAPORES	-Tubos reactivos específicos o colorimétricos de carbón activo o de gel de sílice, con aspiración del aire mediante bombas. - Aparatos de lectura directa - Impingers (frascos borboteadores)	
HUMOS Y NIEBLAS	- Filtros - Impingers - Aparatos de lectura directa	
POLVOS Y FIBRAS	POLVO TOTAL	- Conímetro - Filtros - Impingers
	POLVO RESPIRABLE	- Ciclones - Decantadores

Según su composición, el tipo de polvo se puede definir de la siguiente forma:

- Polvo neumoconiótico: sus efectos dependen de su *fracción respirable* (parte de polvo total suspendida en el aire que alcanza, por su pequeño tamaño, los alvéolos pulmonares depositándose en ellos; el resto es retenido por las mucosas del aparato respiratorio o sedimentan por gravedad) (sílice).
- Polvo tóxico: sus efectos dependen de la cantidad total de polvo suspendido (óxidos metálicos).
- Polvo inerte: no contiene ningún compuesto tóxico y los productos neumoconióticos están en porcentaje inferior al 1%, se les denomina PNCOF (partículas no clasificadas de otras formas) y se les asigna un VLA-ED de 10 y 3 mg/m<sup>3</sup> para la fracción inhalable y respirable, respectivamente.
- Fibras: son aquellas partículas cuya longitud es superior a 10 veces su diámetro medio (amianto, algodón, etc.).

Por tanto, el muestreo del aire en el medio ambiente laboral deberá realizarse de forma selectiva, dependiendo del tamaño de la partícula y tipo de polvo que se quiera determinar. Así, según los métodos estándar del National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) para el muestreo de humos de soldadura [82] se deben utilizar filtros de ésteres de celulosa. El sistema de captación sobre filtros se fundamenta en forzar el paso de un volumen de aire a través de un filtro montado en un portafiltros o cassette. La retención de las partículas del contaminante se basa en fenómenos de tamizado, inercia, gravedad y fuerzas electrostáticas sobre un soporte material o membrana porosa llamado filtro (Figura 13). Los *filtros* son de 37 mm de diámetro, con una eficacia de retención no inferior al 99% para partículas de diámetro aerodinámico medio de 0,3 µm. Los filtros más adecuados son los de ésteres de celulosa (compuestos por mezcla de ésteres



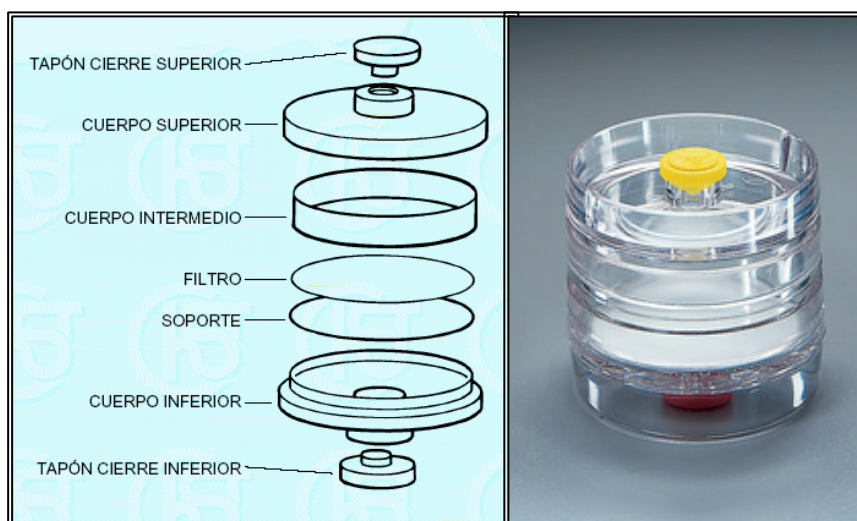


Figura 13.- Partes de un filtro

de celulosa: nitrocelulosa y acetato de celulosa) de  $0,8\ \mu\text{m}$  de tamaño de poro. Para cromo hexavalente se utilizan filtros de PVC de 37 mm de diámetro y  $5\ \mu\text{m}$  de tamaño de poro.

El *portafiltros* tiene 2 ó 3 cuerpos de poliestireno. Tiene que ser compatible con el filtro y el equipo de muestreo utilizado y contiene un soporte de celulosa. El tamaño del orificio de entrada del aire en el portafiltros será al menos de 4 mm para evitar el efecto de la pared. Las *bombas de muestreo* (Figura 14) deben poseer una serie de propiedades: reducido tamaño y escaso peso, autonomía de al menos 8 horas de funcionamiento y la posibilidad de regular el caudal. En el muestreo de aire para la determinación de metales se utilizan bombas de alto caudal ( $0,5\text{-}4,5\ \text{L/min}$ ) con caudal constante dentro de un intervalo de  $\pm 5\%$  de valor nominal durante todo el tiempo del muestreo. La bomba de muestreo y el portafiltros están conectados por un *tubo flexible* de plástico o de goma. Este tubo debe tener una longitud y un diámetro adecuados con el fin de evitar estrangulamientos y fugas en las conexiones [83].

Antes de realizar la toma de muestra, se debe calibrar la bomba a un caudal entre 1-1,5 L/min utilizando un dispositivo para la medición precisa del caudal: *medidor de caudal* de burbuja de jabón capaz de medir el caudal con una precisión del  $\pm 5\%$ .



Figura 14.- Bomba de muestreo

El filtro se monta en el portafiltros y éste se cierra con los tapones adecuados hasta ser instalado para comenzar el muestreo. Cuando se realizan muestreos personales se coloca el portafiltros en la zona de respiración del trabajador. En el caso de toma de muestra de humos de soldadura se debe considerar como zona de respiración del trabajador la que se encuentra detrás de la pantalla de protección (entre la pantalla y la cara del trabajador). Aún siendo conscientes de las dificultades operativas que esto representa, se debe insistir en este aspecto, ya que colocada fuera de la pantalla se pueden alcanzar errores del 300% o superiores en función de la posición y cercanía del trabajador a la columna de humos, por no representar la concentración de los contaminantes medidos la cantidad de contaminante que realmente está inhalando el trabajador expuesto. La bomba de muestreo se sujeta en el cinturón o en cualquier otro lugar de la ropa del trabajador procurando evitar el estrangulamiento del tubo flexible. Cuando se pone en marcha la bomba para comenzar la captación de la muestra se debe anotar la referencia temporal.

El filtro no debe sobrecargarse, para evitar su saturación en la mayoría de los metales generados en un proceso de soldadura un volumen de muestreo de 200 L suele ser adecuado, resultando un tiempo de muestreo de

entre 2-2,5 h. Al finalizar la toma de muestra se anotan el caudal y el tiempo de muestreo. Se retira el portafiltros del sistema de muestreo y se vuelven a poner los tapones para cerrarlo. Se registra la referencia de la muestra y todos los datos del muestreo. Por cada lote de muestras tomadas en las mismas condiciones se adjuntarán 1 ó 2 filtros que serán etiquetados como blancos.

### 5.2.- Preparación de la Muestra: Digestión del Filtro

El método de preparación de la muestra es destructivo e imposibilita cualquier otro análisis sobre el mismo filtro, a excepción del polvo total, si el filtro ha sido previamente pesado. En general, se digiere el filtro por vía húmeda con un ácido o mezcla de ácidos para solubilizar los compuestos de la muestra. Este es el procedimiento incluido en la Norma UNE 81-587-94 [84], en el método aceptado por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) [85] y en el Manual of Sampling and Analytical Methods de la OSHA (Occupational Safety & Health Administration) para la determinación de metales y sus compuestos iónicos en aire [86]. La descripción del procedimiento es la siguiente: *Se abren los portafiltros de muestras y blancos y se transfiere cada filtro a un vaso o matraz erlenmeyer. Se añaden aproximadamente 5 mL de ácido nítrico concentrado, se cubre cada vaso con un vidrio de reloj y se calientan en placa calefactora a 140 °C en el interior de una vitrina extractora de gases. Si las cantidades de materia orgánica fueran elevadas serían necesarias nuevas adiciones de ácido nítrico concentrado hasta completar la digestión de la muestra, lo que se aprecia por el aspecto claro y transparente de la misma. Una ligera ebullición permitirá evaporar la mayor parte del líquido sin llegar a sequedad. Se retira el vidrio de reloj y se lava con 2 ó 3 mL de ácido nítrico diluido al 10% (V/V) recogiendo el residuo del lavado en el vaso que contiene la muestra. Se calienta de nuevo esta disolución a 140 °C para reducir el volumen hasta aproximadamente 0,5-1 mL. Se retira la muestra y se deja enfriar. Las disoluciones se transfieren cuantitativamente a matraces aforados de 10 mL de capacidad, enjuagando cuidadosamente los vasos o erlenmeyers que contienen la muestra y completando hasta dicho volumen con ácido nítrico diluido (10% V/V).*

En el Manual of Analytical Methods del NIOSH (NMAM) [87] y en el Manual of Sampling and Analytical Methods de la OSHA (Occupational Safety & Health Administration) [88] también se propone el uso de mezclas de ácidos como nítrico-perclórico y peróxido de hidrógeno-ácido sulfúrico para la completa digestión de los filtros en una placa calefactora. El empleo de digestión asistida por energía de microondas ha sido propuesto en los Health and Safety Executive (HSE) Methods (MDHS) [89] y por varios autores para la disolución de filtros y polvo procedente del muestreo de aire en el medio ambiente laboral [89-96], lo cual supone en todos los casos una reducción en el tiempo de digestión.

#### 5.2.1. Tratamiento alternativo: Extracción asistida por energía de ultrasonidos

El análisis de elementos traza en muestras sólidas por técnicas espectroscópicas atómicas generalmente conlleva un tratamiento de la muestra para su disolución antes de realizar la detección del elemento metálico que se desea determinar. Este tratamiento suele ser largo y tedioso: se incrementa el tiempo y esfuerzo desarrollado en la toma, procesado y medida de la muestra, además de incrementarse también el riesgo de aparición de errores. La preparación convencional de la muestra requiere un proceso de digestión y la utilización de grandes cantidades de muestra y de reactivos [97].

Una alternativa al procedimiento clásico de digestión de las muestras es la utilización de la energía de ultrasonidos para acelerar los procesos de extracción. Está demostrado que la energía de ultrasonidos facilita y acelera procesos como la disolución y la lixiviación. Los ultrasonidos originan vibraciones que proporcionan agitación de la muestra por generación de burbujas microscópicas que se contraen y expanden y pueden crecer hasta alcanzar un tamaño crítico dando lugar a altas temperaturas (5000 K) y presiones locales (1000 atm), que producen la agitación de la muestra y rotura de las partículas sólidas. La eficacia del proceso de sonicación depende de la potencia del instrumento, del tamaño y geometría de los tubos de digestión y de la posición del transductor [98-101].

---

Las muestras sometidas a energía de ultrasonidos se dispersan de tal forma que originan una fina suspensión que se ataca fácilmente por los reactivos (ácidos o bases). Los procesos de lixiviación en un baño de ultrasonidos proporcionan una mayor eficacia de la disolución de numerosos analitos de muestras complejas y reducen la duración del proceso en comparación con los métodos clásicos de agitación, sobre todo cuando está acoplado en modo continuo. Esta técnica proporciona recuperaciones entre el 94-100%, con una buena reproducibilidad para la mayoría de los compuestos. Se emplea tanto para la extracción de compuestos orgánicos como inorgánicos [102]. La extracción asistida por energía de ultrasonidos puede ser ácida o alcalina. Los metales son extraídos generalmente con ácidos diluidos. Así, el plomo ha sido extraído de los filtros de captación de aire con ácido nítrico diluido (10% V/V) a temperatura ambiente y utilizando un tiempo de extracción de 30 min [103-108]. El Cr(VI) se extrae en un medio básico tamponado para evitar la conversión del Cr(III) a Cr(VI) [109-110], (Métodos OSHA ID-215 [111] y NIOSH 7300, 7605 y 7703 [112-114]).

## 6.- DETERMINACIÓN DE METALES EN PELO

### 6.1.- Toma y Almacenamiento de la Muestra para la Determinación de Elementos Traza

La región más recomendada del cuero cabelludo para tomar la muestra de pelo es la nuca. Esto se debe a que es el lugar menos susceptible de contaminación externa y también porque casi siempre existe pelo en esta región en individuos calvos o con poco pelo. Se cortan unos 2-3 mechones de cabello (de 5 a 10 hebras de pelo cada uno), de 1 a 3 cm de longitud justo en la parte que queda en la base en contacto con la nuca (Figura 15). El pelo puede cortarse con tijeras de acero inoxidable, navaja o con tijeras quirúrgicas con los bordes de corte recubiertos de carburo de tungsteno para evitar la contaminación de la muestra debido a los posibles metales que se puedan aportar a la muestra por fricción durante el proceso de muestreo [115].



Figura 15.- Zona de toma de muestra de pelo

El peso de muestra requerido para la determinación de metales oscila entre 0,5 y 1,0 g en función del elemento que se va a determinar y del procedimiento analítico que será utilizado. Usualmente son suficientes 0,5 g de muestra. Antes de proceder a la toma de la muestra, es necesario limpiar la tijera con acetona para eliminar todo vestigio de grasa y polvo que pudiera quedar en sus superficies de corte. De igual forma, el personal que tomará la muestra debe lavarse las manos antes de proceder a la colección o usar guantes adecuados, evitándose la utilización de talco en la preservación de éstos. Una vez realizada la toma, las muestras se colocan en bolsas o frascos secos de polietileno (lavados previamente con una disolución de ácido nítrico

10%(V/V) durante 48 horas como mínimo y enjuagados después con agua ultrapura) y se guardan en un desecador u otro recipiente de cierre hermético [116].

#### 6.2.- Lavado de la Muestra de Pelo

El pelo que se va a analizar debe ser lavado para eliminar partículas de polvo, sudor, grasa, etc. Cuando se desea determinar el contenido total de determinado elemento presente en el pelo es suficiente un simple lavado con agua. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se desea determinar sólo la concentración de elementos procedentes de la absorción endógena, y es en este caso cuando el proceso de lavado se convierte en la etapa más importante del análisis. Un procedimiento ideal de lavado debería eliminar sólo los contaminantes externos, dejando intactos los elementos endógenos [116].

Existen elementos que están fuertemente ligados al pelo (es el caso de Hg y Cu) y en estas circunstancias se necesitan métodos efectivos de lavado. En este sentido, se ha investigado la adsorción y elución de elementos traza en pelo lavándolo con tres disoluciones (AEDT, ácido nítrico e hidróxido amónico). Así, se concluyó que el AEDT elimina a la mayoría de los elementos ligados al pelo en alguna extensión, por ejemplo el antimonio, bario, cobalto, hierro y manganeso son eliminados completamente con AEDT. Mientras que el mercurio y el cinc son sólo parcialmente eliminados cuando se lava el pelo durante 8 h con AEDT. Sin embargo, el AEDT no elimina nada de oro, selenio o plata [117].

La International Atomic Energy Agency (IAEA) ha examinado diferentes procedimientos de lavado y ha establecido que las variables asociadas a este proceso: eliminación incompleta de contaminantes exógenos y eliminación parcial de contaminantes endógenos son difíciles de controlar. Por lo que para comparar los resultados obtenidos, se debería estandarizar el proceso de lavado [118-119]. Así, el método de la IAEA es el más utilizado, y se basa en el lavado secuencial del pelo con acetona (grado reactivo), agua desionizada (tres veces) y acetona (grado reactivo). El protocolo de la AIEA recomienda que entre cada lavado se cubra el pelo completamente con cada disolución de lavado durante 10 min a temperatura ambiente y con agitación constante. Después, se decanta el líquido y se deja secar el pelo durante 8 h envuelto en

papel de filtro o en una estufa a 100 °C durante aproximadamente 15 min [120-132]. También se han utilizado otros procedimientos de lavado basados en el método de la IAEA, pero utilizando otros disolventes tales como isopropanol, etanol, n-hexano, dietil éter o cloroformo [117, 133-136].

Otros métodos utilizan surfactantes aniónicos, tales como lauril sulfato sódico (LSS), surfactantes no iónicos, tales como Triton X-100 (eliminan más hierro y magnesio que el lavado orgánico) [137-138], mezclas de disolventes orgánicos-surfactante o un ácido diluido (HCl 0,1 M) [139-140].

### 6.3.- Preparación de la Muestra de Pelo

La muestra debe pesarse seca (secada al aire o en estufa) y puede estar pulverizada o en segmentos cortos. La pulverización de la muestra se puede realizar mediante el uso de un molino de bolas (de zirconio o cerámica) con o sin presencia de nitrógeno líquido (criogenización) o en un mortero después de realizar su calcinación [141]. Antes de tomar una alícuota para pesarla, la muestra se tiene que homogenizar.

De todos los tratamientos descritos, el más utilizado es la digestión ácida, ya sea en recipientes abiertos o cerrados [142]. La hidrólisis alcalina se utiliza en menor proporción cuando se pretenden determinar elementos inorgánicos en el pelo, siendo más frecuentemente empleada cuando se quieren determinar compuestos orgánicos. La disolución con hidróxido de tetrametilamonio (HTMA) tiene la ventaja de minimizar la pérdida de elementos volátiles, siendo un método eficaz para el análisis de pelo por espectrometría de absorción y emisión atómica [143-144].

Los ácidos normalmente utilizados para llevar a cabo la digestión ácida son el nítrico, clorhídrico y sulfúrico. Si la digestión se realiza en un recipiente cerrado, las metodologías más recientes utilizan un horno de microondas, y en este caso sólo basta adicionar ácido nítrico y peróxido de hidrógeno para realizar la digestión. Así, con este método, las cantidades de reactivos que se necesita adicionar son menores, lo que minimiza los problemas de contaminación [120, 127, 129, 131, 134, 135]. En el Manual of Analytical Methods del NIOSH (NMAM) [87], se propone la digestión ácida con una mezcla de ácido nítrico: ácido perclórico y ácido sulfúrico en proporción 3:1:1 para disolver muestras de tejidos.



El pelo también puede ser analizado en forma de suspensiones o directamente por espectrometría de absorción atómica con cámara de grafito [145]. En el caso de las suspensiones, éstas se pueden preparar directamente en los viales del muestreador automático. La estabilización de la muestra normalmente se realiza mediante la utilización de surfactantes como Triton X-100 o glicerol, entre otros. Aunque los inconvenientes de este método son que el proceso de pulverización puede contaminar la muestra y en algunas ocasiones, la falta de homogeneidad de las suspensiones [146-148].

#### 6.3.1. Tratamiento alternativo: Extracción asistida por energía de ultrasonidos

Al igual que ocurre con el tratamiento de los filtros de captación de aire, una alternativa al procedimiento clásico de digestión de las muestras es la utilización de la energía de ultrasonidos para acelerar los procesos de extracción de los metales. Así, se ha propuesto la extracción ácida de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, Cd, Cr, Hg, Pb y Se de muestras de pelo (0,2-0,3 g). La disolución extractante es una mezcla de ácido nítrico (3,3-4,8 M), ácido clorhídrico (3,0-4,8 M) y peróxido de hidrógeno 0,5 M, y la extracción se produce en un baño de ultrasonidos durante 10 min a una temperatura de 80-90 °C. Una vez efectuada la extracción para separar la matriz de la muestra de la fase líquida que contiene los elementos extraídos, se debe efectuar una centrifugación a 3000 rpm durante 10-20 min. Después de separar el líquido, se procede a lavar el residuo con agua ultrapura y se repite la centrifugación a 3000 rpm otros 10-20 min. Por último, se pasan ambas fases líquidas a un matraz aforado de 10 mL llevándolo hasta el enrase con agua ultrapura [149-151].

## 7.- DETERMINACIÓN DE METALES EN ORINA

### 7.1.- Toma y Almacenamiento de la Muestra para la Determinación de Elementos Traza

La muestra de orina se recoge directamente en un frasco de polietileno (Fig. 16). Este frasco debe estar previamente lavado con ácido nítrico y enjuagado con agua ultrapura [152].



Figura 16.- Recipiente para la toma de muestra de orina

Antes de proceder a la toma de muestra, se debe instruir a la persona que va a proporcionar la muestra con las siguientes recomendaciones, para minimizar los riesgos de contaminación: lavar las manos con jabón y enjuagarlas muy bien con agua, y una vez tomada la muestra, cerrar el frasco inmediatamente. Normalmente, según las recomendaciones de la American Conference of Governmental Industrial Hygienists' (ACGIH), las muestras de orina se deben recoger al final de la jornada laboral [153].

Una vez filtradas a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, las muestras se almacenan a 4 °C, pero el tiempo de almacenamiento debe ser el mínimo posible, especialmente en el caso de aquellos elementos que coprecipitan en presencia de algunos compuestos. En el caso de que el tiempo de almacenamiento sea grande, las muestras se almacenan a -20 °C. Dependiendo del tipo de análisis, la orina puede ser acidificada añadiendo ácido nítrico o clorhídrico como conservante. Antes de efectuar el análisis, las muestras se tienen que agitar para homogenizarlas.

### 7.2.- Preparación de la Muestra de Orina

Para preparar la muestra de orina se pueden incluir las siguientes etapas: dilución, digestión y preconcentración y/o separación.

Las matrices biológicas como la orina, las cuales contienen elevadas concentraciones de elementos alcalinos y alcalinotérreos en comparación con los elementos traza y un alto contenido salino, son difíciles de determinar directamente sin realizar ningún tratamiento a la muestra debido a las interferencias producidas por su matriz. Para evitar estos inconvenientes, una solución es diluir la muestra con un ácido (aunque esto en algunas circunstancias es una dificultad, ya que disminuye la sensibilidad). En el caso de estas medidas directas por espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica, se utilizan modificadores de matriz, tales como nitrato de paladio, ácido nítrico, o peróxido de hidrógeno, y añadiendo una corrección de fondo (corrección Zeeman o corrector de deuterio) se reduce notablemente la señal de fondo, siendo posible la determinación directa de elementos traza en las muestras de orina [132, 154-155]. Este es el método aceptado por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) para la determinación de cromo [156].

En algunos casos, se realiza una digestión ácida con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno de las muestras de orina que puede realizarse en recipientes abiertos utilizando una placa calefactora o un horno de microondas [157-160].

Cuando se necesita incorporar una etapa de preconcentración para incrementar la sensibilidad de la metodología analítica, se han utilizado mayoritariamente resinas quelatantes o sólidos adsorbentes. Por ejemplo, el cobalto se retiene en Amberlita XAD-7 como complejo cobalto-2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol a pH 9,5. El cobalto se eluye con ácido perclórico. El factor de preconcentración obtenido fue de 90 [161-162]. La Amberlita XAD-16 impregnada con 4-(2-tiazolilazo) resorcinol (TAR) se ha usado para retener metales presentes en la muestra de orina [163]. También se ha utilizado la resina Muromac A-1 con grupos iminodiacético, realizando la

elución de los metales retenidos con ácido nítrico [164]. Se ha propuesto un procedimiento para la preconcentración de Cd, Cu, Co y Pb adsorbiendo los complejos que forman estos metales con el pirrolidín ditiocarbamato de amonio en un filtro de membrana de nitrato de celulosa [165].

Para la determinación de plomo en orina, el INSHT [166] y en el Manual of Analytical Methods del NIOSH (NMAM) [87], proponen una extracción líquido-líquido, donde el plomo se compleja con pirrolidinditiocarbamato de amonio (APDC) y el complejo se extrae con isobutilmetilcetona (MIBK). En el NMAM [87] se propone para la determinación de aluminio, bario, cadmio, cromo, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, níquel, platino, plata, estroncio, estaño, titanio y cinc, la preconcentración de estos metales en una resina con grupos poliditiocarbamato, y su elución se realiza con un medio ácido.

---

## 8.- DETECCIÓN DE LOS METALES EN AIRE, PELO Y ORINA

La espectrometría de absorción atómica con llama o con atomización electrotérmica es la forma más usual de realizar la determinación de metales en todo tipo de muestras higiénicas y medioambientales [167-168]. En la mayoría de los casos, la espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS) alcanza la sensibilidad suficiente para detectar el contenido en metales en las muestras de aire procedentes del medio ambiente laboral y de pelo de los trabajadores expuestos a los contaminantes metálicos. Así, también en la Norma UNE 81-587-94 [84], en el método aceptado por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) [85, 156, 166] y en el Manual of Sampling and Analytical Methods de la OSHA (Occupational Safety & Health Administration) [86], se propone la determinación de metales por espectroscopia de absorción atómica. Sin embargo, en el caso de las muestras de orina procedente de trabajadores expuestos a contaminantes metálicos, sólo en casos muy concretos se puede realizar la determinación directa de los metales por FAAS debido a que no se alcanza la sensibilidad suficiente.

La espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción es una técnica también propuesta para efectuar la determinación de metales en muestras procedentes del medio ambiente laboral, ya que esta técnica permite realizar un análisis multielemental. De hecho esta es la técnica utilizada por el Manual of Analytical Methods del NIOSH (NMAM) y en el Manual of Sampling and Analytical Methods de la OSHA (Occupational Safety & Health Administration) [86-88].

## 9.- ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

Los métodos automáticos de análisis surgen de la necesidad de mejorar las características del proceso analítico. Estos pueden clasificarse en:

- Métodos automáticos discontinuos.
- Métodos automáticos continuos.
- Métodos robotizados.

Los métodos automáticos continuos hacen referencia a aquellas metodologías analíticas en las que la concentración del analito es medida sin interrumpir el flujo del líquido o gas [169]. Los métodos continuos no segmentados son denominados como métodos de Análisis por Inyección en Flujo (FIA), siendo su característica fundamental que el flujo no se encuentra segmentado por burbujas de aire, además de que la muestra es inyectada en vez de aspirada y en el momento de la detección no tiene lugar ni el equilibrio físico ni químico. Las características fundamentales de esta técnica son:

- El flujo es continuo, no está segmentado por burbujas de aire.
- La muestra líquida es inyectada directamente en el sistema, pudiendo ocurrir algún proceso adicional a este transporte (reacción química, técnica de separación, etc.).
- La dispersión o dilución parcial del analito en el transporte puede ser perfectamente manipulada.
- Un sistema de detección proporciona una señal que es registrada de forma continua.
- En el momento de detección de la señal no se ha alcanzado ni el equilibrio físico ni químico.
- El tiempo de operación debe ser reproducible, por lo que pequeñas variaciones pueden significar grandes alteraciones en los resultados.

En resumen, se pueden destacar cuatro puntos clave en la metodología FIA:

- Flujo no segmentado.
- Introducción continua de muestra y/o reactivos mediante inyección directa.
- Dispersión parcial controlada.
- Tiempo de operación reproducible.

El esquema básico de un sistema FIA se muestra en la Figura 17 y se describe a continuación [170].

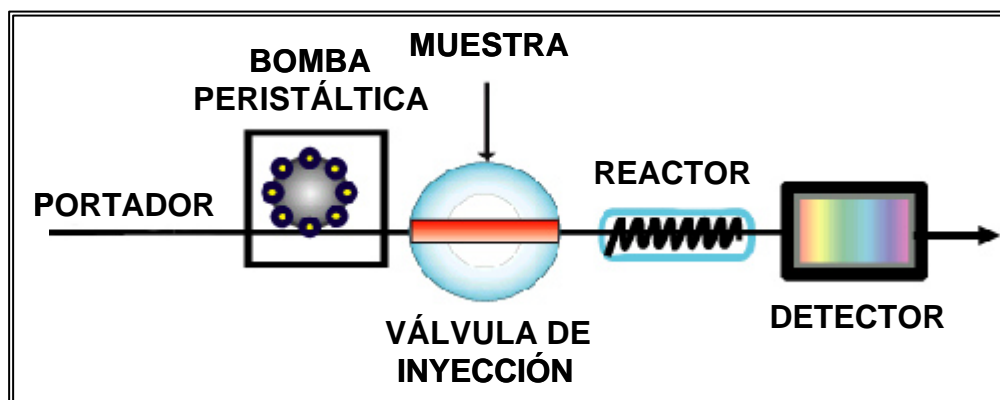


Figura 17.- Componentes básicos de un sistema FIA

\* Un sistema de propulsión para impulsar el fluido a lo largo del montaje FIA, normalmente se trata de una bomba peristáltica, la cual debe proporcionar un caudal constante y perfectamente reproducible. Las ventajas de este tipo de bombas son bajo coste, facilidad y rapidez de parada.

\* Un sistema de inyección que permita introducir continuamente la muestra dentro de la corriente de líquido portador sin interrumpir el flujo. Debe cumplir los siguientes requisitos:

- Insertar volúmenes exactos y perfectamente reproducibles de la disolución problema.
- La intercalación de la muestra en el fluido portador debe producirse de forma que no se creen perturbaciones.

- Su manejo debe ser fácil y cómodo, de forma que se consiga una elevada frecuencia de muestreo.

El sistema de inyección usado es la válvula rotatoria, siendo el más común la válvula hexagonal. Esta válvula consta de seis orificios, tres de entrada y tres de salida, pudiendo adquirir dos posiciones (llenado y vaciado). Las características más importantes de este tipo de válvulas son: reproducibilidad de los volúmenes del bucle, rapidez, facilidad de manejo y posibilidad de automatización.

\* Los *sistemas de transporte/reacción* son tubos de pequeño diámetro. Estos tubos deben ser de un material químicamente inerte e inalterables a los cambios de temperatura dentro de un amplio margen. Los tubos de bomba más utilizados son de Tygon o PVC para disoluciones acuosas y Solvaflex para disoluciones orgánicas. La unión de los tubos entre sí y con las diversas partes del sistema se lleva a cabo mediante conectores.

En algunos casos la tubería puede estar empaquetada con materiales químicamente activos que transforman la muestra, en otros casos puede incluir mezcladores o módulos de separación en los que se produce un transporte de masa a través de interfases de tipo gas-líquido, líquido-líquido o sólido-líquido.

\* Un sistema de detección, que adquiera la señal y la transduzca en el momento en el que el bolo de muestra pase a su través. Pueden ser detectores no destructivos (potenciómetros, fluorímetros, espectrofotómetros, etc.) o destructivos (espectroscopía atómica).

### 9.1.- Acoplamiento FIA-Espectroscopía de Absorción Atómica con Llama (FAAS)

El esquema de un sistema de este tipo es muy simple: el portador continuamente bombeado se aspira hasta el nebulizador sin ser necesaria la correspondiente célula de flujo (Figura 18). La inserción de la muestra en el mismo da lugar a su aparición en el nebulizador [171]. Esta técnica presenta una serie de ventajas:



- Las muestras con alto contenido salino pueden inyectarse en la corriente de portador sin que después surjan dificultades características de la aspiración directa. El problema de la viscosidad se reduce mucho.
- Durante la operación el sistema se lava continuamente.
- El consumo de volumen de muestra es muy pequeño.
- El sistema FIA permite el muestreo repetitivo a considerable velocidad.
- El FIA permite también la introducción de disoluciones patrón o estándares internos a la muestra en una corriente de flujo. Estas inyecciones adicionales se pueden hacer en otros puntos a lo largo de la corriente, pero lo más usual es que se inserten por el mismo lugar por donde se introduce la muestra.

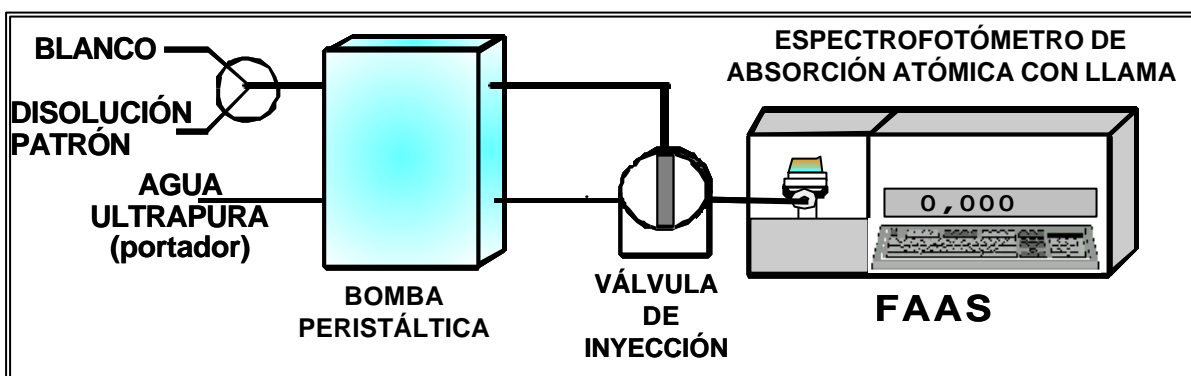


Figura 18.- Acoplamiento FIA-FAAS

Una característica común de las técnicas atómicas-FIA es el uso de dispersión baja, lo cual es un factor positivo adicional que contribuye a alcanzar una mayor sensibilidad. Además, permite realizar el análisis de muestras que tienen un volumen muy pequeño.

Se ha comprobado que el caudal del líquido portador determina el tiempo de respuesta, sensibilidad, precisión y contaminación entre muestras en el nebulizador.

En condiciones normales el caudal a través del quemador no debe ser menor que la velocidad de aspiración del espectrómetro.

La principal ventaja del acoplamiento FIA-EAA es el desarrollo de sistemas automáticos para la manipulación on-line del analito antes de su introducción en el espectrofotómetro. Sus principales objetivos son:

- Procesar un gran número de muestras.
- Reducir la participación humana y, por tanto, evitar errores y aumento de costos.
- Bajo consumo de muestra y/o reactivos.
- Desarrollo de procedimientos simples, seguros y aplicables a muestras de distinta naturaleza.
- Reducir los riesgos de contaminación.

## 10.- AUTOMATIZACIÓN EN LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS: MÉTODOS CONTINUOS UTILIZANDO ENERGÍA DE ULTRASONIDOS

La eficaz aplicación de la lixiviación on-line asistida con energía de ultrasonidos se ha demostrado con estudios realizados en diferentes muestras sólidas, comprobándose que se obtenían extracciones cuantitativas disminuyendo considerablemente el tiempo de lixiviación. Obteniéndose así excelentes resultados que concordaban con los obtenidos por los métodos manuales estándar. La extracción continua de metales en muestras sólidas usando energía de ultrasonidos combinada con un sistema FIA ha resultado ser un método rápido, sencillo y cuantitativo para el pre-tratamiento de muestras sólidas. Otras ventajas de esta metodología son la reducción de la contaminación de la muestra y de las pérdidas de analito debido a una mínima manipulación de la muestra, bajo consumo de reactivos y de muestra, y disminución del tiempo en el tratamiento de dicha muestra.

Además, si se compara la metodología continua con el método de extracción off-line se demuestra que el tiempo de sonicación se reduce en un factor de 6-12 y también se evitan etapas que en algunos casos son necesarias, como la centrifugación para la separación de la fase líquida.

Así, la energía de ultrasonidos ofrece diferentes ventajas, como son:

- un amplio campo de aplicación que incluye cualquier muestra independientemente de su forma y con un tamaño de partícula adecuado.
- la extracción cuantitativa del analito, lo que facilita la estandarización con matrices similares a la muestra.

Este procedimiento combina los beneficios de la extracción asistida con energía de ultrasonidos con los obtenidos por los sistemas FIA.

Para la extracción cuantitativa del analito se usan ácidos diluidos, lo cual elimina los riesgos existentes cuando se manipulan ácidos concentrados, evitando además, la generación de vapores tóxicos derivados de los ácidos como son los vapores nitrosos. La extracción con ultrasonidos depende de la

cinética de lixiviación, es decir, si ésta es rápida, la disolución lixivante pasa con un caudal una sola vez a través de la celda de radiación ultrasónica (conteniendo la muestra) consiguiendo la separación cuantitativa del analito (Figura 19). Por el contrario, si la cinética es lenta, el lixivante debe pasar repetidamente a través de la celda electrolítica (Figura 20).

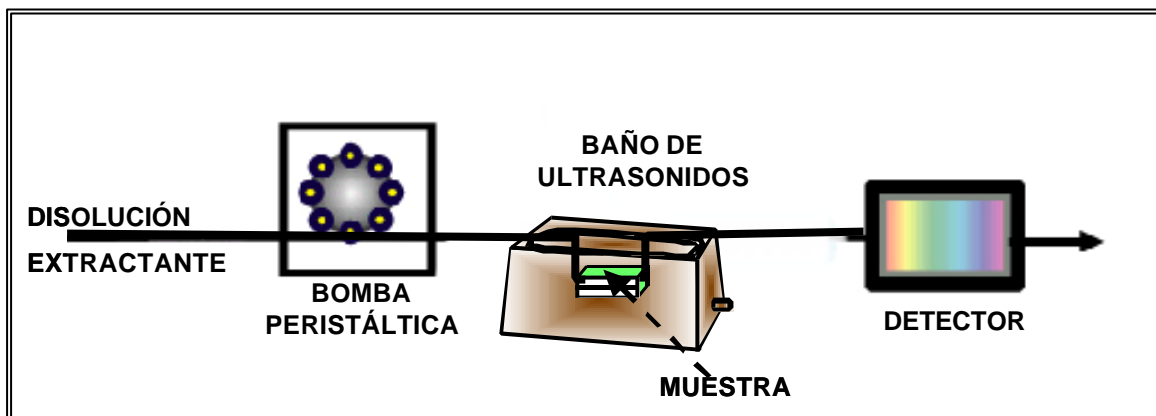


Figura 19.- Sistema FIA de extracción en línea utilizando energía de ultrasonidos para reacciones de cinética rápida

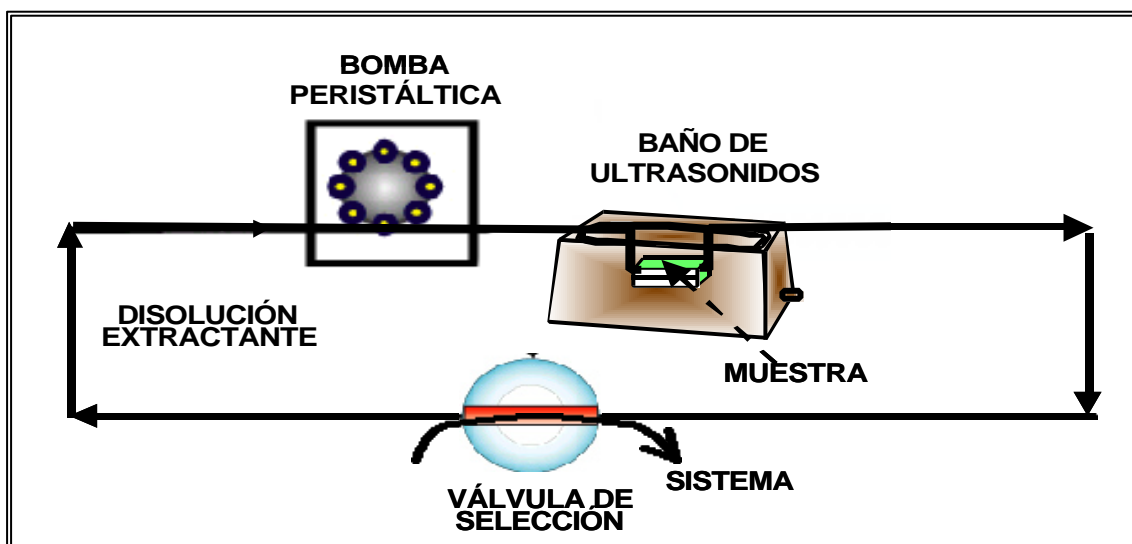


Figura 20.- Sistema FIA de extracción en línea utilizando energía de ultrasonidos para reacciones de cinética lenta

---

La aplicación de la extracción en línea con ultrasonidos se ha demostrado en estudios realizados con diferentes muestras sólidas. De esta manera, utilizando esta metodología se ha determinado mediante espectroscopia UV-VIS la cantidad total de boro en suelos [172], el contenido total de hierro en plantas [173] y Cr(VI) en suelos [174]. Utilizando sistemas de extracción continua acoplados con detectores atómicos se han determinado cobre, hierro, manganeso, cromo, calcio, cadmio y plomo en moluscos y pescados [175-180], hierro, cinc plomo, cadmio, cromo, cobre, calcio y magnesio en carne [181-182], cadmio y plomo en plantas y vegetales [183-184], cadmio en productos lácteos sólidos [185], y calcio, magnesio, hierro, cobre y cinc en comida para animales [186].

## 11.- EL ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO APLICADO EN LA DETERMINACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE HIGIENE INDUSTRIAL

Como se ha comentado anteriormente, el análisis por inyección en flujo (FIA), es un modo de trabajo que permite dar un paso importante en el proceso de automatización del proceso analítico, siendo una alternativa a de los métodos químicos analíticos desarrollados manualmente. De hecho es un importante avance metodológico en Química Analítica, ya que con un fundamento relativamente simple y un manejo sencillo se logra fácilmente la automatización del proceso analítico. Además, los sistemas FIA, tienen una gran capacidad para lograr excelentes resultados con rapidez, precisión y reducción de costos debido al equipo sencillo, a la rapidez de los análisis y a la miniaturización de sistema y muestras. Su extremada versatilidad hace que se adapte con simplicidad a todo tipo de necesidades sin cambios técnicamente complejos en los dispositivos utilizados. Por otra parte, permite la incorporación de unidades de separación en línea para la eliminación de interferencias y/o preconcentración de analitos. Estas modalidades, que se pueden acoplar a variados sistemas de detección permiten aumentar su campo de aplicabilidad. Todas estas ventajas han hecho que se hayan propuesto metodologías analíticas para la determinación de metales en distintos tipos de muestras: alimentos, muestras medioambientales (sobre todo aguas), productos farmacéuticos, etc.

Se ha hecho una revisión bibliográfica (hasta el año 2007) sobre los métodos propuestos para la determinación de metales en muestras de higiene industrial (humos de soldadura, polvo, materia particulada y aire del medio ambiente laboral, pelo y orina de trabajadores expuestos a contaminación por metales) que utilizan el FIA. Para ello, se ha utilizado el Chemical Abstract a través del programa SciFinder Scholar [187], la base de datos de E.H. Hansen en la página web de FIALab Instruments [188] y the Flow Analysis Database de Stuart Chalk (Universidad de Florida) [189]. Los resultados de esta revisión se reflejan en la Figura 21.

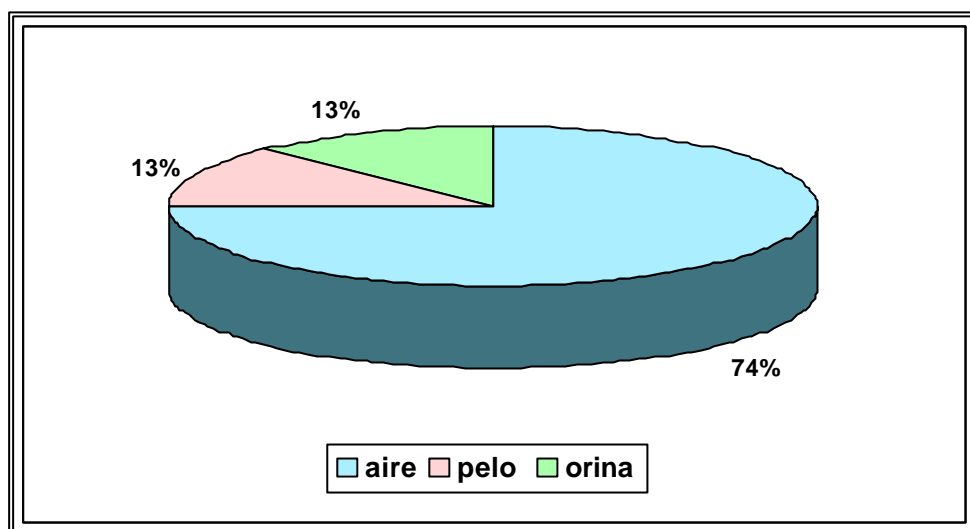


Figura 21.- Proporción entre los métodos FIA propuestos para la determinación de metales en muestras higiénicas

En la Figura 21 se puede observar que la mayor parte de los métodos FIA propuestos para muestras higiénicas (74%) lo son para aire (humos de soldadura, polvo, materia particulada y aire del medio ambiente laboral). Sin embargo, estos trabajos publicados son muy pocos: seis en el caso de las muestras de aire, uno de muestras de pelo y uno donde se propone una metodología FIA para el análisis de metales en orina de trabajadores expuestos a contaminación metálica.

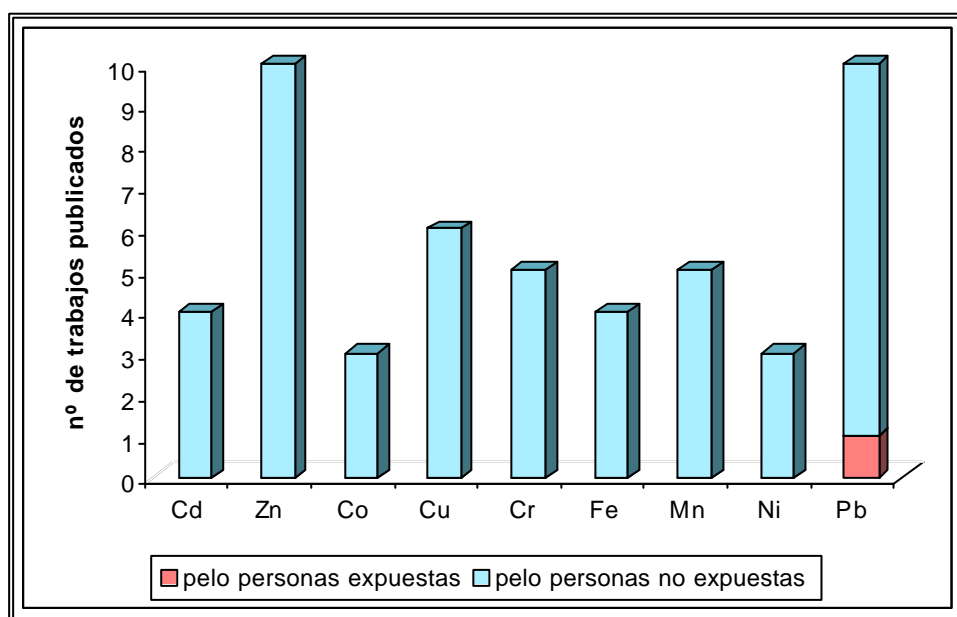


Figura 22.- Comparación entre los métodos FIA propuestos para la determinación de metales en pelo de personas expuestas y no expuestas

En las Figuras 22 y 23, se comparan los métodos FIA propuestos para la determinación de metales en pelo y orina de personas expuestas y no expuestas. En ambos tipos de matrices, sólo se ha propuesto un método FIA para la determinación de plomo en pelo y orina de personas expuestas a contaminación metálica.

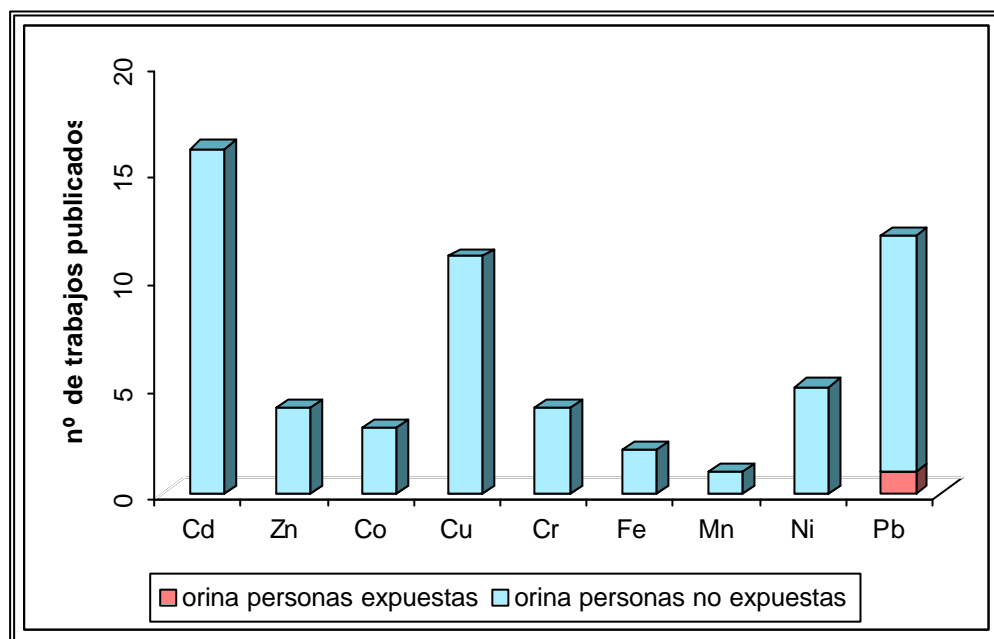


Figura 23.- Comparación entre los métodos FIA propuestos para la determinación de metales en orina de personas expuestas y no expuestas

De todas maneras, en general, los métodos FIA propuestos para la determinación de metales en muestras de pelo y orina tampoco son muy numerosos, 49 y 57, respectivamente, en comparación con otro tipo de matrices como pueden ser alimentos o aguas que son los tipos de muestras para los que más métodos FIA se han propuesto (sólo para plomo en aguas se han publicado unos 150 trabajos). En la Figura 22 se observa que los metales para los que se han propuesto más métodos FIA para su determinación en pelo son Zn y Pb (10 trabajos), mientras que los metales para los que se han propuesto menos métodos FIA para su determinación en pelo son Ni y Co (3 trabajos). En la Figura 23 se observa que los metales para los que se han propuesto más métodos FIA para su determinación en orina son Cd y Pb (16 y 12 trabajos, respectivamente), mientras que los metales



para los que se han propuesto menos métodos FIA para su determinación en orina son Fe y Mn (2 y 1 trabajos, respectivamente).

#### 11.1. Muestras de Aire (Humos de Soldadura, Polvo, Materia Particulada y Aire del Medio Ambiente Laboral)

En los trabajos publicados, el analito más determinado es el Cr(VI). Por el contrario, no se han propuesto metodologías FIA para la determinación de Zn, Co y Ni (Figura 24). Aunque las metodologías FIA propuestas sólo proponen realizar de manera continua el proceso de preconcentración y/o de detección, y en ninguno de los casos se propone la extracción continua del analito de los filtros de captación.

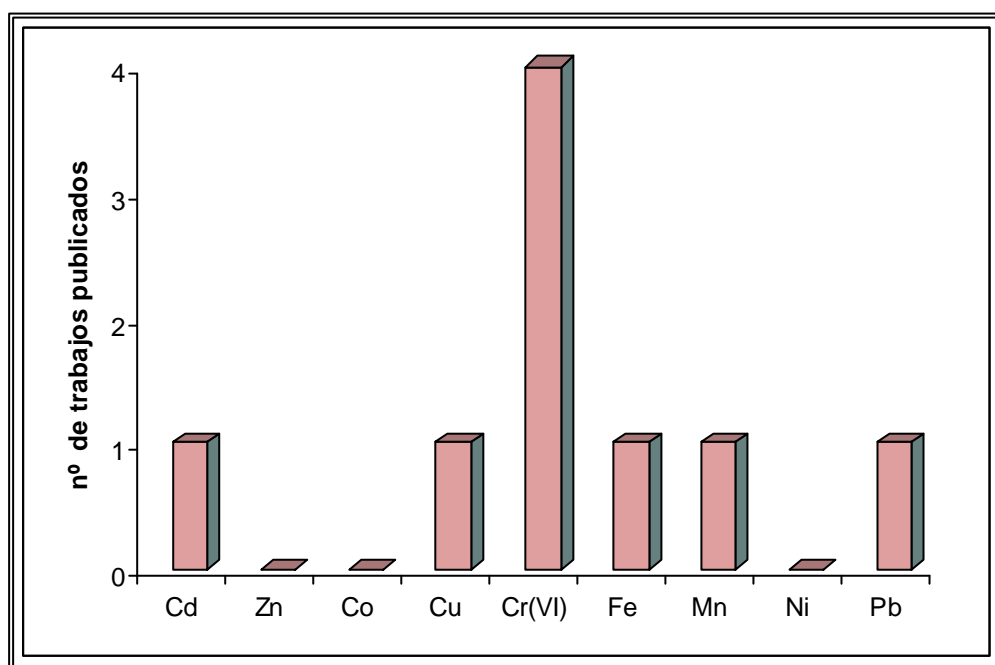


Figura 24.- Métodos FIA propuestos para la determinación de metales en muestras de aire del medio ambiente laboral

Girard y col. [190] realizan la especiación de cromo en humos de soldadura. La extracción de Cr(VI) se produce con una disolución reguladora acético-acetato a pH 4, mientras que el cromo total se determina previa digestión con ácido nítrico concentrado. La determinación de Cr(VI) y Cr total la realizan en línea en un sistema FIA equipado con dos detectores (un espectrofotómetro UV-VIS para determinar el Cr(VI) después de reaccionar con la 1,5-difenilcarbácida, y un espectrofotómetro de absorción atómica con llama, para determinar el Cr total).

Wang y col. [191] proponen un método para la determinación de Cr(VI) en polvo procedente del medio ambiente laboral. El Cr(VI) es extraído en medio alcalino (pH 8) con una mezcla sulfato amónico-amoniaco y después preconcentrado en un sistema FIA en una resina aniónica (Dowex 1-X8). Después de eluir el Cr(VI) con una mezcla sulfato amónico-amoniaco (pH 8), el Cr(VI) se determina en línea por espectrofotometría UV-VIS previa formación de un complejo con 1,5-difenilcarbácida.

Gautam y col. [192] describen la determinación de Cr (VI) en materia particulada procedente del medio ambiente laboral. Después de extraer el Cr(VI) en medio alcalino, lo preconcentran en un sistema FIA utilizando una resina aniónica (AG 4-X4). La elución se lleva a cabo con perclorato sódico y el Cr(VI) se determina en línea por espectrofotometría UV-VIS previa formación de un complejo con 1,5-difenilcarbácida.

Zheng y col. [193] llevan a cabo una metodología FIA basada en la reacción del Cr(VI) con la 1,5-difenilcarbácida para realizar la determinación en línea de Cr(VI) procedente del aire del medio ambiente laboral por espectrofotometría UV-VIS.

Hernández y col. [194] estudian la determinación de manganeso, plomo y cobre en un sistema semiautomático FIA, utilizando una microcolumna conteniendo la resina quelatante Dowex A-1 (grupos iminodiacético) para la preconcentración de estos metales en muestras de humos de soldadura. Los filtros de captación de aire los digieren con ácido nítrico, y una vez disueltas, las muestras se insertan en el sistema FIA. La determinación de estos metales, una vez eluidos con ácido clorhídrico diluido, la realizan en línea por espectrometría de absorción atómica con llama (aire-acetileno).

Gao y col. [195] proponen una metodología FIA para la determinación de plomo y cadmio en materia particulada procedente del medio ambiente laboral por espectrometría de absorción atómica con llama. Los metales fueron extraídos fuera de línea de los filtros de captación mediante extracción ácida asistida con energía de ultrasonidos, obteniéndose recuperaciones superiores al 97%, siendo luego preconcentrados en línea con una resina con grupos iminodiacético y determinados utilizando un sistema FIA.

### 11.2. Muestras de Pelo

Burguera y col. [196] propusieron un método para la determinación de plomo en pelo de trabajadores de una gasolinera. Las muestras de pelo las digirieron fuera de línea en medio ácido con energía de microondas y el plomo de determinó por espectroscopía de absorción atómica utilizando un sistema de flujo continuo. Previamente, el pelo se lavó con etanol y agua. El contenido en plomo encontrado en estas muestras estuvo dentro del intervalo 17,5 – 48,7  $\mu\text{g/g}$ . Esta concentración fue significativamente más alta que la determinada en muestras control (pertenecientes a personas no expuestas), las cuales estaban dentro del intervalo 8,1 -17,2  $\mu\text{g/g}$ .

### 11.3. Muestras de Orina

Burguera y col. [197] realizaron la extracción de plomo en muestras de orina con pirrolidín ditiocarbamato de amonio en isobutil metil cetona. Una alícuota de este extracto se inyectó en un sistema FIA-FAAS, utilizando agua como líquido portador. La concentración media de plomo encontrada en la orina de trabajadores expuestos fue de  $71,7 \pm 2,3 \mu\text{g Pb/L}$ , mientras que la determinada en muestras control (pertenecientes a personas no expuestas), fue de  $39,0 \pm 8,3 \mu\text{g Pb/L}$ .

## 12.- TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO ANALÍTICO. DISEÑOS EXPERIMENTALES

La optimización con diseños experimentales presenta diversas ventajas frente a la optimización variable a variable, que consiste en fijar todas las variables del sistema, a excepción de una, en unos valores de partida, elegidos en función de los conocimientos del investigador a cerca del sistema, o en el peor de los casos en base a la intuición. Una vez definidos los valores de partida, se realiza un número de experimentos alterando el valor de la variable que no ha sido fijada para posteriormente seleccionar el valor que produzca un mejor resultado para dicha variable. A continuación, se realiza la misma operación con todas las variables, de una en una, hasta que el proceso de búsqueda proporcione un resultado óptimo.

El consumo de tiempo y de dinero son los principales inconvenientes de este tipo de optimización, así como la suposición de que las variables del sistema son independientes, lo que puede conducir a errores en la búsqueda del óptimo. Dichos inconvenientes han provocado la necesidad de plantear otras técnicas de optimización, como son los diseños experimentales.

El proceso de diseño y optimización experimental consta de tres etapas fundamentales [198]:

- 1.- Selección de las variables que van a influir de forma significativa sobre el sistema.
- 2.- Selección de la función de respuesta o función objetivo para la evaluación de la superficie de respuesta.
- 3.- Optimización experimental que puede ser de dos tipos:
  - a) Tipo analítico (tipo simultáneo): Están representados principalmente por el diseño factorial, y permiten evaluar la localización del óptimo por la derivación de la ecuación "superficie de respuesta".
  - b) Tipo Caja Negra (Tipo secuencial): Están representados principalmente por el Método Simples Geométrico y permiten un desconocimiento total del sistema a estudiar, ya que cada experimento se establece a partir de la evaluación de los resultados anteriores.

Este trabajo se centrará en el estudio de los diseños factoriales.

### 12.1.-Diseño Factorial

Es un tipo de diseño experimental muy conocido que se suele emplear en la investigación de superficies de respuesta multifactor. Para conocer un sistema es necesario establecer las características de las superficies de respuesta representadas frente a uno o más factores. Estos diseños además de permitir variar simultáneamente de forma sistemática varios factores en cada experiencia, permiten revelar la existencia de interacciones entre los factores cuando están presentes en un sistema.

Los parámetros que verdaderamente describen un diseño son el número de factores involucrados y el número de niveles de cada factor, resultando un número de combinaciones de factores generado por el diseño factorial completo. En el método más habitual del diseño factorial se dan dos valores a cada variable a ambos lados de un valor básico o central (diseño factorial completo a dos niveles). Al centrar y normalizar cada factor, los valores para el nivel superior e inferior serán  $+1$  y  $-1$ , respectivamente, mientras que la coordenada del punto central será  $0$ . El número de veces que aparece  $+1$  en cada columna de las matrices de diseño es exactamente igual al número de veces que aparece  $-1$ , dándole al diseño propiedades ortogonales.

La función de respuesta, se suele aproximar dentro de una región determinada del espacio de los factores, mediante un polinomio de primer orden, de segundo orden e incluso en algunos casos mediante polinomios de orden superior. Ninguna de estas ecuaciones producirá una representación exacta de la función de respuesta verdadera, sino solamente aproximaciones al modelo en una región restringida del espacio de los factores. En base al modelo asumido se realizará el diseño de los experimentos necesarios que una vez realizados servirán para evaluar los coeficientes del modelo, evaluar su significación estadística y el grado de coincidencia entre el modelo asumido y la superficie de respuesta. El procedimiento debe de hacerse cíclico para perfeccionar el modelo, a partir de los datos obtenidos en los diseños previos.

La evaluación de la superficie de respuesta implica un análisis estadístico de los resultados que permite conocer la significación de los coeficientes del polinomio y la coincidencia entre el polinomio y el verdadero valor de la función de respuesta. Por lo tanto, es necesario comprobar que la varianza de la respuesta es constante (no depende de los valores del factor).

Si el diseño es ortogonal, los coeficientes se determinan de forma independiente y las varianzas de los errores de determinación de estos coeficientes son todas iguales entre sí.

La significación de los coeficientes estimados se establece mediante un test Student. La coincidencia entre el polinomio evaluado y el valor de la función de respuesta verdadera se determina mediante el test F [199-202].

#### 12.1.1.- Diseños factoriales de superficie de respuesta

Esta metodología es considerada como una herramienta para construir modelos empíricos que utilizan técnicas secuenciales de experimentación para reconocer un campo de interés y focalizar en él las variables más importantes y sus efectos. Mediante estos diseños se puede evaluar la curvatura en la superficie de respuesta, usando un polinomio de segundo grado o superior.

Los atributos deseables de los diseños de superficie de respuesta son ortogonalidad y rotabilidad. La ortogonalidad consiste en permitir alcanzar regiones de confianza simétricas en todas las dimensiones (círculos y esferas), opuestamente a los asimétricos que conducen a regiones asimétricas (elipses y ovoides). Las regiones simétricas son más pequeñas que las asimétricas, por lo que los intervalos de confianza individuales son más pequeños para los diseños ortogonales que para los no ortogonales. Un diseño es rotable si la función de varianza (la media estandarizada del error al cuadrado asociado con la estimación de la variable dependiente) es constante a distancias fijas desde el origen del espacio del diseño. Si un diseño tiene esta propiedad, cualquier rotación del mismo en el espacio considerado genera idénticas varianzas. Este tipo de diseños es más adecuado cuando se quieren obtener datos cuantitativos de la forma de actuar de las distintas variables que afectan al sistema a diferencia de los de Screening que son adecuados para construir modelos generales cualitativos acerca de la influencia de las distintas variables en el sistema.

- Diseño factorial central composicional + estrella:

El modelo polinomial completo de segundo orden es uno de los modelos más útiles para la aproximación de una región de una superficie de respuesta multifactor. Este diseño es bastante útil, ya que permite obtener una estimación de los parámetros. Sin embargo, no permite estimar los parámetros de segundo orden. Para situaciones que implican menos de cuatro factores hay pocas combinaciones de factores para estimar todos los parámetros del modelo. Los diseños de estrella son una alternativa muy válida, ya que además de la estimación de los parámetros permiten estimar los parámetros de segundo orden.

La yuxtaposición de un diseño factorial a dos niveles con un diseño de estrella genera el diseño composicional, que puede utilizarse para estimar todos los parámetros en un modelo polinomial completo de segundo orden. Estos diseños constan de dos partes un cubo y una estrella. La parte del cubo corresponde a un diseño de Screening y la de la estrella consiste en un conjunto adicional de puntos equidistantes del centro del cubo en radios que pasan por el punto central de cada cara del cubo. Si los centros de los dos diseños experimentales coinciden, el diseño resultante es un diseño central composicional. Si los centros no coinciden el resultado es un diseño no central composicional.

Los diseños central composicional son relativamente eficaces para un número pequeño de factores. La replicación suele ser incluida en los diseños central composicional.

#### 12.1.2.- Diseños factoriales de Screening

Este tipo de diseños se utilizan para distinguir entre un elevado número de factores aquellos que son influyentes en un sistema.

- Diseño factorial de Plackett-Burman:

Mediante el diseño factorial de Plackett-Burman se reduce el número de experimentos a realizar, por eso se suele utilizar cuando son varios los factores que van a influir sobre el sistema. Dichos diseños son también denominados cíclicos. La matriz del diseño se construye a partir de una primera fila dada en el trabajo original de Plackett-Burman [203] en el que

están disponibles los diseños para 8, 12, 16, etc. variables en bloques de 4 hasta 100, es decir, combinaciones de factores que son múltiplos de 4.

La primera fila es secuencialmente rotada hacia la derecha para dar cada columna sucesiva. El último experimento fija todos los valores al nivel más bajo. A estos diseños se les conoce como matrices de diseño Hadamard, diseños factoriales fraccionales y matrices ortogonales. El número de veces que aparece +1 en cada columna de las matrices de diseño es exactamente igual al número de veces que aparece -1, dándole al diseño propiedades ortogonales. Si se dispone de la primera fila, la construcción de estas matrices es muy sencilla, aunque no es aplicable a cualquier número de variables por cuestiones de ortogonalidad. Si son pocas las variables y se quiere aplicar un modelo de diseño Plackett-Burman se tienen que considerar las variables que sobran como falsas o postizas. Estas variables tendrán sus coeficientes que serán muy pequeños o tendrán valor 0.

Como se reducen experimentos en comparación con el diseño factorial completo, también se pierden grados de libertad, lo que provoca un efecto de confusión para cada variable respecto de los términos de interacción. Esto mismo ocurre para las variables, y por tanto, sus coeficientes incluirán efectos de interacción de las demás. Estos efectos proporcionan dos tipos de información:

- 1.- Conocer hasta que punto las interacciones son despreciables
- 2.- Si no existen interacciones, es una forma de evaluar los errores puramente experimentales.

Por combinación de los niveles de diseño para las variables involucradas en cada fila de la matriz, se van a obtener la evaluación de los efectos de interacción que se asocian en cada efecto lineal de una variable "falsa" o "verdadera".





## **Capítulo II.-**

### ***Justificación y Objetivos***



---

En los principales procesos y operaciones industriales es frecuente encontrar numerosos casos de exposición de los trabajadores a metales. En este sentido, los trabajos de soldadura son una de las tareas más utilizadas en la industria metal-mecánica, y de uso generalizado por el servicio de mantenimiento de cualquier tipo de industria. La soldadura es considerada como uno de los trabajos más peligrosos, esta afirmación se basa en varias razones [204]:

- a) Hay múltiples factores que pueden poner en peligro la salud de un soldador, tal como el calor, quemaduras, radiación, ruido, humos, gases, electrocución, y tampoco se deben olvidar los riesgos ergonómicos debidos a las posturas incómodas que se desarrollan durante el trabajo.
- b) La elevada variación en la composición química de los humos de soldadura, la cual depende de la composición de la pieza a soldar y del metal de aportación.
- c) Las diversas rutas de entrada por las que estos contaminantes penetran en el cuerpo. Los peligros químicos más comunes incluyen metales y gases nocivos (ozono y óxidos de nitrógeno).

El Real Decreto 374/2001, sobre la "Protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo" indica que *"la evaluación de riesgos derivados de la exposición por inhalación a un agente químico peligroso deberá incluir la medición de las concentraciones del agente en el aire, en la zona de respiración del trabajador, y su posterior comparación con el valor límite ambiental que corresponda"* [26]. Por tanto, la cuantificación del riesgo higiénico ocasionado por la presencia de metales en el medio ambiente laboral implica la medición de las concentraciones de dichos contaminantes.

Sin embargo, la determinación de la concentración de tóxicos en el aire ambiente del puesto de trabajo es esencial para la vigilancia de las condiciones higiénicas y para la identificación de los peligros, pero no permite

una valoración exacta de la exposición de cada trabajador concreto [205]. De hecho, la monitorización ambiental como medio de evaluación de la exposición presenta ciertas particularidades:

- los niveles de exposición a los que está sometida una persona pueden ser variables.
- sólo tiene en cuenta la vía de absorción pulmonar y por tanto no será válida para sustancias que puedan ser absorbidas por otras vías. Las diferencias entre los hábitos higiénicos de los trabajadores pueden condicionar de forma importante la absorción de algunos tóxicos por vía oral y cutánea.
- no tiene en cuenta las variaciones biológicas intraindividuales ni las interindividuales.
- la cada vez más frecuente exposición múltiple dificulta la monitorización ambiental.

No obstante, el control biológico de los metales presentes en el medio ambiente laboral, mediante determinaciones analíticas en especímenes biológicos recogidos del trabajador, se puede utilizar como índice representativo de dosis interna y, por tanto, compararlo con valores límite biológicos. Aunque tradicionalmente han sido la sangre y la orina las muestras que se han utilizado como indicadores biológicos de la exposición a metales, la concentración de éstos en estos medios puede variar dependiendo de distintas condiciones fisiológicas o medioambientales. Sin embargo, el análisis de pelo puede proporcionar información fiable sobre los metales que se han acumulado en el cuerpo como resultado de la exposición a éstos en el medioambiente laboral.

La evaluación de la exposición a metales requiere disponer de métodos de toma de muestra y análisis que permitan conocer la concentración de los metales en el aire ambiente de trabajo y/o la concentración de éstos en determinadas muestras biológicas del trabajador. Para ello es necesario disponer de metodologías analíticas sensibles, precisas, exactas, y además

---

que sean rápidas y automáticas, lo que permitiría alcanzar una elevada frecuencia de muestreo. Todas estas características no se encuentran en la mayoría de los métodos analíticos propuestos hasta la fecha porque cuando se trata de analizar muestras sólidas (polvo y humos en los filtros de captación de aire, pelo y uñas) y muestras con elevado contenido salino (orina), el gran problema que surge es el tedioso tratamiento de la muestra. Además, está sujeto a numerosas posibilidades de pérdidas y contaminación, sobre todo cuando se trata del análisis de concentraciones traza de metales. Por tanto, el objetivo principal de este trabajo de investigación ha sido eliminar totalmente estos inconvenientes provocados por el manejo de muestras complejas y facilitar su análisis porque sería ideal poder incorporar los logros obtenidos en este sentido, como métodos de rutina en laboratorios de higiene industrial analítica. En los métodos oficiales propuestos para la determinación de metales en el aire procedente del medioambiente laboral, el método de preparación de la muestra (filtro de captación de aire) es destructivo e imposibilita cualquier otro análisis sobre el mismo filtro. En general, se digiere el filtro por vía húmeda con ácidos concentrados. La determinación de metales en muestras biológicas también presenta numerosos problemas, causados principalmente a los bajos contenidos metálicos, por la gran variación de la matriz de una muestra a otra, así como por la posibilidad de contaminación. En consecuencia, los métodos analíticos convencionales, que implican el tratamiento de las muestras para destruir la materia orgánica y la extracción de los analitos, no son recomendables porque además de ser muy laboriosos, suponen un alto riesgo de contaminaciones o pérdida de analitos. También, en general, se propone la digestión con ácidos o mezcla de ácidos para disolver muestras de tejidos. En el caso de las muestras de orina, para la determinación de metales por técnicas espectroscópicas atómicas, los métodos oficiales del INSHT y en el NMAM, proponen la extracción líquido-líquido o la utilización de resinas formadoras de quelatos previa digestión en medio ácido de las muestras. Sin embargo, los métodos ideales han de requerir un tratamiento mínimo de las muestras y presentar bajos límites de detección. Los inconvenientes relativos al tratamiento de muestras sólidas se evitan utilizando un método de extracción asistida por energía de ultrasonidos. Con este proceso, al utilizar disoluciones diluidas de ácidos o bases, y energía no

elevada, sólo se produce la completa disolución de los metales sin producirse la destrucción de la restante materia que conforma la muestra analítica. Esta preparación de la muestra es una etapa crítica dentro del proceso analítico. Mientras que los avances en la instrumentación analítica han sido muy importantes, la preparación de la muestra no ha variado significativamente en los últimos años y sigue siendo la etapa más tediosa del análisis. Por este motivo, el tiempo necesario para llevar a cabo el proceso analítico está condicionado por la preparación de la misma. El Análisis por Inyección en Flujo (FIA) es una alternativa a la solución de este problema, ya que permite realizar la automatización de todas las etapas del proceso analítico. El sistema continuo propuesto hace posible trabajar directamente con muestras sólidas, lo cual resulta muy ventajoso, para lograr la extracción ácida de las mismas mediante energía de ultrasonidos. Evitando, de esta manera, tener que realizar este proceso en una etapa a parte con los inconvenientes, sobre todo en lo que se refiere a consumo de tiempo, que esto supondría. De la misma manera, los procesos de preconcentración en línea, son la mejor alternativa a los laboriosos procesos realizados de manera manual.

En este trabajo de investigación se han desarrollado métodos analíticos para la determinación de metales en el aire procedente del medioambiente laboral, así como en muestras biológicas de los trabajadores de fácil obtención (orina y pelo) para estudiar el nivel de exposición a metales en el lugar de trabajo. Estos métodos son sensibles, precisos, exactos, rápidos y automáticos. Todo lo cual facilitará su implementación como métodos de rutina en laboratorios de higiene industrial analítica, y hará posible conocer, de una manera sencilla y rápida, el nivel de exposición de los trabajadores a los metales en su lugar de trabajo y su nivel de acumulación. Además, se podrá garantizar la calidad del ambiente de trabajo, comprobando que el contenido metálico no sobrepase los límites permitidos, comparando la concentración existente con los valores límite ocupacionales (VLAs y TLVs) y con los valores límite biológicos (VLB, BEI y BAT). Todo lo cual demuestra su importancia económica y social, por la sencilla instrumentación analítica requerida y un bajo consumo de reactivos (una de las características de la metodología FIA), y por la rápida obtención de información analítica capaz de resolver un

---

problema analítico que ha demandado la sociedad (relativo a aspectos de seguridad e higiene industrial).

La contaminación por metales en el lugar de trabajo constituye un problema creciente para la seguridad y salud de los trabajadores. El gran número de controles analíticos requeridos por la higiene industrial hace surgir la necesidad de automatizar los procesos analíticos en este campo, donde todavía no se han propuesto metodologías completamente en línea. Desde la evidencia de que las operaciones previas del proceso analítico son una asignatura pendiente en Química Analítica, se propone la resolución de problemáticas en este contexto. Así, este trabajo comprende dos rutas de investigación que pretenden la simplificación, miniaturización y automatización de todas las etapas del proceso analítico mediante el empleo de diferentes estrategias:

- 1) Desarrollar y proponer nuevos montajes de extracción asistida con energía de ultrasonidos en flujo continuo acoplados a técnicas espectroscópicas atómicas (espectrometría de absorción atómica con llama, FAAS) que permitan el pretratamiento en línea de los filtros de captación de aire y de muestras biológicas de los trabajadores de fácil obtención (pelo) para realizar la determinación de metales.
- 2) Estudiar y proponer pretratamientos en línea para las muestras de orina: digestión asistida por energía de ultrasonidos, preconcentración y/o eliminación de las interferencias, dilución, en esta matriz con alto contenido salino para realizar la determinación de los metales en línea por FAAS.

Estas dos rutas con un objetivo común: estudiar y proponer una alternativa a los laboriosos procesos realizados de manera manual para estos tipos de muestras y analitos.

Se trata, en definitiva, del desarrollo de metodologías analíticas innovadoras, automáticas, rápidas y sencillas que permiten resolver

problemáticas analíticas reales cuando se trata de analizar muestras procedentes del medio ambiente laboral. La importancia de esto radica en que se eliminan los siguientes problemas:

- 1) Las Técnicas Espectroscópicas Atómicas son sencillas y asequibles para cualquier laboratorio, aunque la principal limitación que plantean es el pretratamiento que necesitan las muestras sólidas.
- 2) Los métodos oficiales de análisis de metales en el aire del lugar de trabajo, digieren los filtros por vía húmeda con un ácido o mezcla de ácidos concentrados para solubilizar los compuestos captados y el filtro donde se encuentran depositados. Un tratamiento similar se utiliza con las muestras biológicas. En consecuencia, estos métodos analíticos convencionales, no son recomendables porque además de ser muy laboriosos, pueden provocar contaminación o pérdida de analito(s).
- 3) La utilización de ácidos concentrados es un riesgo para el analista, sobre todo el producido por los vapores nitrosos generados en el proceso de digestión, sin olvidarse del elevado tiempo que se tarda en realizar el proceso y que se introduce la matriz de la muestra en el instrumento analítico, produciendo interferencias de matriz al efectuar la determinación de los metales por técnicas atómicas. Todos estos inconvenientes se superan al utilizar el método de la extracción asistida con energía de ultrasonidos.
- 4) Las escasas metodologías FIA existentes hasta la fecha, sólo proponen realizar de manera continua el proceso de preconcentración y/o de detección, y en ninguno de los casos la extracción continua del analito de los filtros de captación de aire. Lo mismo ocurre para las muestras de pelo.



- 5) Los laboriosos procesos realizados de manera manual que proponen los métodos oficiales para preconcentrar y/o eliminar interferencias en una matriz con alto contenido salino como es la orina.

Por tanto, la principal innovación y principal objetivo que se ha pretendido alcanzar en este trabajo de investigación es la automatización del tratamiento previo de las muestras procedentes del medio ambiente laboral para que sean una alternativa a los métodos convencionales.

Así, los objetivos planteados para la realización de este estudio han sido los siguientes:

- Ensayar y evaluar distintas disoluciones extractantes (ácidos, mezcla de ácidos o bases diluidas) y su concentración en función del tipo de matriz de la muestra y del tamaño de partícula, para llevar a cabo la extracción continua de iones metálicos en muestras de pelo y en los filtros de captación de aire.
- Optimizar los procesos de extracción continua estableciendo los criterios de máxima recuperación, simplicidad y rapidez.
- Ensayar y evaluar una resina quelatante para realizar un proceso continuo de separación con las muestras de orina.
- Diseñar y optimizar sistemas FIA que incorporen el dispositivo de extracción continua y que permitan la detección continua de los metales por FAAS (para muestras de aire y pelo).
- Diseñar y optimizar sistemas FIA que incorporen dispositivos de digestión/preconcentración/separación o dilución, y que permitan la detección continua de los metales por FAAS (para muestras de orina).
- Aplicar los métodos propuestos a la determinación de metales en humos de soldadura (aire), pelo y orina de los trabajadores expuestos a contaminación metálica para comprobar su aplicabilidad, y que de esta

manera puedan incorporarse como métodos de rutina en laboratorios de higiene industrial analítica.

El interés de estos objetivos se puede englobar diciendo que lo que se pretende es conseguir por vez primera la automatización y miniaturización de todo el proceso analítico cuando se trata de analizar muestras (sólidas, líquidas y gaseosas) procedentes del medioambiente laboral. Desde las operaciones previas, pasando por la etapa de medida instrumental, y finalizando por el tratamiento de los datos obtenidos. Esto permitirá elaborar las conclusiones acerca de la resolución del problema que ha iniciado este proceso analítico lo más rápido y de la manera más sencilla posible, lo cual sería una situación ideal para los laboratorios de higiene industrial analítica. De esta manera, se lograrán eliminar los inconvenientes provocados por los métodos convencionales propuestos en los métodos oficiales de análisis (un tedioso tratamiento para la disolución de las muestras y que además, está sujeto a numerosas posibilidades de pérdidas de analito(s) y contaminación de la muestra, sobre todo cuando se trata del análisis de metales traza).



**Capítulo III.-**  
***Parte Experimental 1:***  
***Determinación de Metales en***  
***Humos de Soldadura***



## 1.- MUESTREO DE LOS HUMOS DE SOLDADURA

## 1.1. Descripción del Puesto de Trabajo Muestreado

Las muestras de aire se tomaron en talleres con puestos de trabajo de soldadura pertenecientes a empresas con actividad construcción metálica, calderería, y construcción naval. Entre los materiales utilizados en los procesos de soldadura en estas empresas se encuentran chapa de acero inoxidable, acero naval y acero galvanizado. Estos materiales presentan la composición que se muestra en la Tabla VIII.

Tabla VIII.- Composición de los materiales soldados

	Composición (%)										
	C	Mn	Si	P	S	Ni	Cr	Cu	Al	Pb	Co
Chapa de acero inoxidable 1	0,15	1,1	0,21	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	-	-
Chapa de acero inoxidable 2	0,16	1,2	0,25	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	-	-
Chapa de acero inoxidable 3	0,05	2,4	0,3	0,02	0,04	7,2	20	0,4	-	0,004	0,03
Chapa de acero naval	0,21	0,6	0,5	0,04	0,04	0,40	-	0,35	0,01	0,2	-
Chapa de acero galvanizado (55 % Al + 43,4 % Zn + 1.6 % Si)	0,15	0,6	0,03	0,03	0,03	-	-	-	0,02	-	-

El tipo de soldadura utilizado fue soldadura al arco con gas protector del tipo MIG (Metal-Inert Gas) y los electrodos (material de aportación) presentan la composición que aparece en la Tabla IX.

Tabla IX.- Composición de los materiales de aportación

	Composición (%)								
	C	Mn	Si	P	S	Ni	Cr	Cu	Mo
Material de aporte 1	15	41	20	1,5	3,2	18	15	16	-
Material de aporte 2	0,06	1,57	0,35	0,01	0,01	1,8	-	-	0,4
Material de aporte 3	0,08	1,40	0,80	-	-	0,9	0,4	0,4	-

### 1.2. Muestreo y Puntos de Muestreo de Aire

Con el objetivo de estimar la exposición de los soldadores a los metales procedentes de los humos de soldadura, se establecieron tres puntos de muestreo estáticos (ambientales) y un punto de muestreo personal. Los puntos de muestreo estáticos se establecieron a 2, 1 y 0,5 m desde la zona donde se realiza la operación de soldadura (puntos de muestreo I, II y III, respectivamente) y colocando al trabajador el aparato de muestreo, de manera que la zona de captación de aire, es decir el filtro, estuviera cerca de su nariz (punto de muestreo IV, según se indica en la página 58). La captación de aire se realizó mientras se estaba produciendo la operación de soldadura y las muestras de aire se recogieron a un caudal de 1,5 L/min para todos los metales y a 2,0 mL/min para el Cr(VI) durante distintos tiempos (dependiendo del punto de muestreo y del metal a medir).

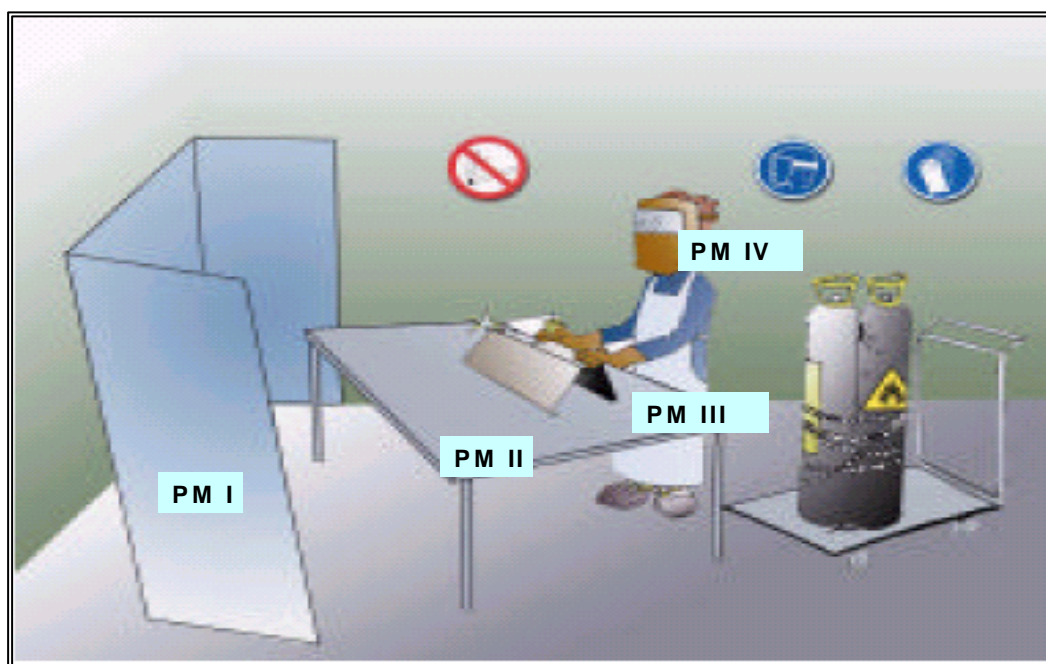


Figura 25.- Puntos de muestreo en el taller de soldadura

Tabla X.- Situación de los puntos de muestreo de aire

Punto de muestreo	Tipo	Distancia desde la zona donde se realiza la soldadura (m)
I	Estático (ambiental)	2
II	Estático (ambiental)	1
III	Estático (ambiental)	0,5
IV	Personal	0

### 1.3. Aparatos de Toma de Muestra de Aire

Las muestras de aire se recogieron en filtros de membrana de ésteres de celulosa (Millipore) con tamaño de poro  $0,8 \mu\text{m}$  y 37 mm de diámetro. En el caso de la toma de muestras de nieblas de ácido crómico ( $\text{Cr(VI)}$ ) se utilizaron filtros de cloruro de polivinilo (PVC) de  $5 \mu\text{m}$  de porosidad y 37 mm de diámetro. Cada uno de estos filtros se coloca en un portafiltros de poliestireno conteniendo un soporte de celulosa. El aire del medio ambiente laboral se aspira con bombas de muestreo de alto caudal Gilian HFS-513 (Sensidyne, USA), las cuales permiten obtener un caudal constante entre 750 y 5000 mL/min.

## 2.- DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA CONTINUO DE LIXIVIACIÓN ASISTIDA POR ENERGÍA DE ULTRASONIDOS

Este estudio se ha enfocado en la extracción y determinación de cadmio, cinc, cobalto, cobre, cromo, hierro, manganeso, níquel y plomo en los filtros de captación de aire. Para ello se ha diseñado un dispositivo FIA en el que se pueden distinguir dos etapas fundamentales:

- Lixiviación continua del filtro en una columna de pequeñas dimensiones.
- Conducción del lixiviado obtenido al sistema de detección (FAAS) mediante un líquido portador.

En las Figuras 26 y 27 se muestra el sistema FIA empleado para la lixiviación de la muestra y posterior detección de los metales presentes en la misma.

La bomba peristáltica (B1) impulsa la disolución lixivante hacia el circuito que una vez lleno, se cierra mediante la VS1. Esta disolución se mantiene durante un cierto tiempo y a una determinada temperatura en contacto con la muestra y bajo la acción de la energía de ultrasonidos. Mientras se mantiene la disolución lixivante en contacto con el filtro para que se produzca la lixiviación de los metales, el bombeo se irá alternando en ambos sentidos para evitar las obstrucciones en el sistema por compactación de la muestra (en este caso el filtro) en uno de los extremos de la minicolumna. Transcurrido el tiempo de lixiviación, se gira la válvula de selección (VS2) de modo que el lixiviado pasa a la parte del sistema FIA que lo conducirá al detector, mientras que la disolución blanco pasa al desecho. En esta etapa del sistema FIA, el lixiviado es transportado hacia el detector. Una vez que el lixiviado se conduce a través de la válvula de selección (VS2), atraviesa un reactor cuya función es homogeneizarlo. Después, un pequeño volumen de lixiviado se inyecta a través de una válvula de inyección en una disolución portadora que lo transportará hacia al detector (Espectrofotómetro de absorción atómica con llama).



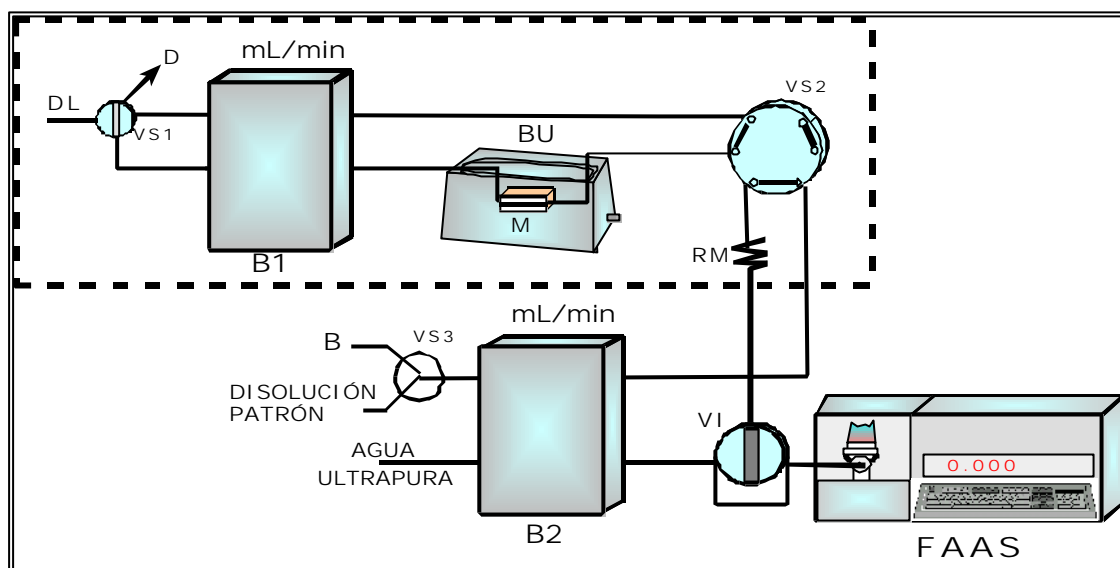


Figura 26.- Sistema FIA usado para la determinación de metales en los filtros de captación de aire. B, blanco; BU, baño de ultrasonidos; B1 y B2, bombas peristálticas; D, desecho; DL, disolución lixiviante; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama; M, columna conteniendo la muestra (filtro); RM, reactor de mezcla; VI, válvula de inyección; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección

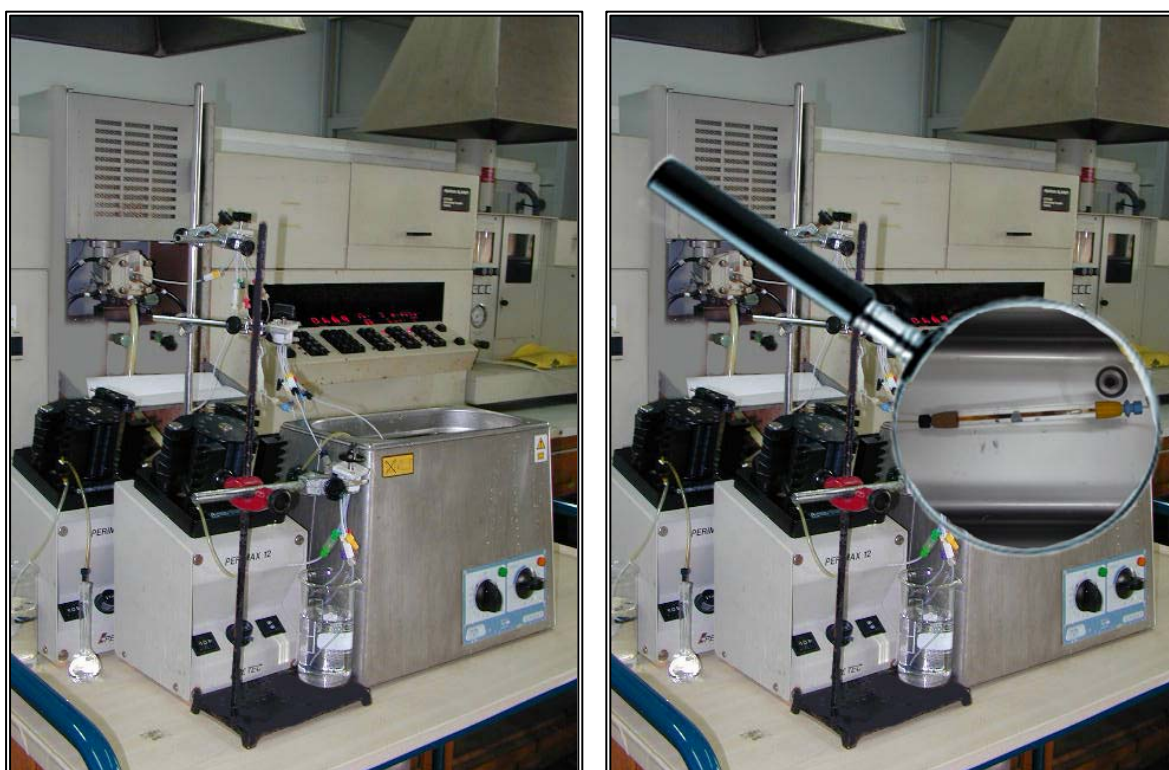


Figura 27.- Fotografías del sistema FIA utilizado, donde se puede observar el acoplamiento con la Espectroscopia de Absorción Atómica con Llama

## 2.1.- Aparatos, Instrumentación Analítica y Reactivos

### *Aparatos e Instrumentación Analítica*

- Bombas peristálticas GILSON MINIPULS 3, con ocho canales y selector de velocidad.
- Tubos para bomba peristáltica de vitón (resistente a ácidos) y de Tygon (tipo especial de PVC transparente).
- Minicolumna de vidrio borosilicatado químicamente inerte (OMNIFIT) de 3 mm de diámetro interno y 100 mm de longitud con dos terminales fijos y 0,70 mL de volumen de lecho.

El sistema FIA consta de un circuito cerrado que contiene una columna de pequeñas dimensiones en la cual se introduce la muestra (en este caso el filtro de captación de aire) (Figura 28). Además, se coloca en cada extremo de la columna un papel de filtro (Whatman 541) para evitar cualquier obturación del sistema por pérdidas de partículas metálicas durante el proceso.

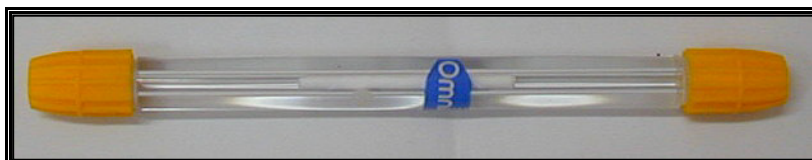


Figura 28. Fotografía de la columna en la que se introduce el filtro en el sistema FIA

- Ultrasonidos SELECTA de 550 vatios de potencia con selector de temperatura y tiempo programable. Frecuencia de ultrasonidos 40 kHz.
- Válvulas de selección y de inyección de tipo hexagonal (Rheodyne).
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer, modelo 5000, con llama aire-acetileno y sistema nebulizador de bola de impacto y mechero de 10 cm. Este espectrómetro está conectado a un registrador Perkin Elmer Modelo 50.

Todo el material de vidrio y plástico fue lavado y almacenado en ácido nítrico al 10% (V/V) al menos durante 48 h. Después, antes de ser utilizado se enjuagó tres veces con agua ultrapura (Milli-Q).

### *Reactivos*

- Ácido nítrico (Merck): 65%,  $d=1,39$  g/mL,  $P_m=63,01$  g/mol.
- Ácido clorhídrico (Merck): 30%,  $d=1,15$  g/mL,  $P_m=36,46$  g/mol.
- Agua ultrapura de  $18,2$  M $\Omega$  cm de resistividad específica, obtenida por el sistema Milli-Q (Millipore Corp.).
- Disolución patrón de cadmio (Merck): 1000 mg/L ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  en  $\text{HNO}_3$  0,5 mol/L).
- Disolución patrón de cinc (Merck): 1000 mg/L ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  en  $\text{HNO}_3$  0,5 mol/L).
- Disolución patrón de cobalto (Merck): 1000 mg/L ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  en  $\text{HNO}_3$  0,5 mol/L).
- Disolución patrón de cobre (Merck): 1000 mg/L ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  en  $\text{HNO}_3$  0,5 mol/L).
- Disolución patrón de cromo(III) (Merck): 1000 mg/L ( $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$  en  $\text{HNO}_3$  0,5 mol/L).
- Disolución patrón de cromo (VI): Se preparó disolviendo 0,2833 g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (Merck) en 100 mL de agua ultrapura: 1000 mg/L Cr(VI).
- Disolución patrón de hierro (Merck): 1000 mg/L ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  en  $\text{HNO}_3$  0,5 mol/L).
- Disolución patrón de manganeso (Merck): 1000 mg/L ( $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$  en  $\text{HNO}_3$  0,5 mol/L).
- Disolución patrón de níquel (Merck): 1000 mg/L ( $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  en  $\text{HNO}_3$  0,5 mol/L).
- Disolución patrón de plomo (Merck): 1000 mg/L ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  en  $\text{HNO}_3$  0,5 mol/L).

### 3.- OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA LIXIVIACIÓN DE LOS METALES CONTENIDOS EN EL FILTRO DE CAPTACIÓN DE AIRE EN EL SISTEMA FIA: DISEÑOS EXPERIMENTALES

#### 3.1. Diseños de Screening

Inicialmente, para realizar la optimización de un sistema es necesario conocer las variables que potencialmente afectan a dicho sistema. Debido a que en este proceso el número de variables es elevado (6 variables) es necesario aplicar un diseño factorial de *Screening*, para reducir de modo significativo el número de experimentos a realizar. Uno de los diseños de *Screening* más utilizados es el diseño de Plackett-Burman. Este diseño permite fraccionar un diseño factorial completo proporcionando números de combinaciones de factores que son un múltiplo de cuatro. Por ejemplo, si se aplicara un diseño factorial completo a 2 niveles para 6 variables ( $2^6$ ) implicaría la realización de 64 experimentos frente a los 13 experimentos que se realizarían utilizando un diseño de Plackett-Burman considerando un punto central, como el que se aplica en este trabajo.

Las variables a optimizar en este sistema son las siguientes:

- ❖ Concentración de  $\text{HNO}_3$
- ❖ Concentración de  $\text{HCl}$
- ❖ Tiempo de sonicación
- ❖ Temperatura de lixiviación
- ❖ Caudal de lixiviación
- ❖ Volumen de lixivante

Siendo el ácido nítrico y el clorhídrico la disolución lixivante.

Para poder realizar este diseño factorial es necesario considerar para cada variable o factor dos niveles (un valor máximo y un valor mínimo para cada variable). Estos valores fueron seleccionados en función de experimentos realizados en estudios previos (Tabla XI).

Tabla XI.- Variables y Niveles Considerados para el Diseño Factorial de Screening

VARIABLE	CLAVE	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
[HNO <sub>3</sub> ]	A	0 M	3M
[HCl]	B	0 M	3 M
Temperatura de lixiviación	C	20 °C	70 °C
Tiempo de sonicación	D	0,5 min	5 min
Caudal de lixiviación	E	3 mL/min	6 mL/min
Volumen de lixivante	F	2 mL	5 mL

El diseño factorial aplicado es el de Plackett-Burman  $2^{6*3/16}$  que implica realizar 13 experimentos que fueron aleatorizados para evitar errores de sistema (Statgraphics Plus v.5.1). En este diseño se ha considerado un punto central en el que las variables toman un valor medio entre el límite superior e inferior. La Tabla XII recoge la matriz correspondiente a este diseño factorial con los 13 experimentos a realizar para la optimización del proceso. En esta matriz se indica como +1 cuando la variable en el experimento toma como valor el límite superior, como -1 cuando toma el límite inferior y 0 cuando toma el valor medio.

- |   |                       |
|---|-----------------------|
| - Tipo de Diseño: Screening                           |                       |
| - Nombre del Diseño: Plackett-Burman ( $2^{6*3/16}$ ) |                       |
| - Número de factores experimentales: 6                |                       |
| - Número de respuestas: 1                             |                       |
| - Número de experimentos: 13                          | - Puntos centrales: 1 |
| - Error grados de libertad: 6                         | - Aleatorio: Si       |

Tabla XII.- Matriz del Diseño de Plackett- Burman  $2^6 \times 3/16$  en el que se Obtienen 13 Experimentos para las Seis Variables Implicadas

Experimento	Variables Codificadas					
	A	B	C	D	E	F
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1
7	0	0	0	0	0	0
8	-1	+1	+1	+1	-1	+1
9	-1	-1	+1	+1	+1	-1
10	-1	-1	-1	+1	+1	+1
11	+1	-1	-1	-1	+1	+1
12	-1	+1	-1	-1	-1	+1
13	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Tal y como se puede observar en la matriz de experimentos la última fila dada por este tipo de diseño está formada por los valores mínimos de cada variable. Además, se mantiene la ortogonalidad, ya que el número de veces en que aparecen los niveles altos (+1) es igual al número que aparecen los niveles bajos (-1).

Una vez obtenida esta matriz, se realizaron los experimentos fijados por la misma de manera aleatoria. El diseño factorial se aplicó a muestras tomadas en distintos puntos de muestreo y con distintos tiempos de muestreo, elegidos según la concentración y la sensibilidad de cada metal.

La concentración de los metales en los puntos muestreados también se determinó mediante el método establecido por el INSHT [85]. Las concentraciones así determinadas en estos puntos fueron las que aparecen en la Tabla XIII. Además, esto ha permitido comprobar la homogeneidad de las muestras calculando el coeficiente de variación (CV) para cada metal, los cuales también se muestran en la Tabla XIII. Como se puede observar, estos valores, todos menores del 10%, se pueden considerar como aceptables para considerar homogéneas las muestras obtenidas con diferentes bombas al mismo tiempo.

Tabla XIII.- Concentraciones de los Metales en Distintos Puntos de Muestreo  
Obtenidas por el Método Oficial

	Punto de Muestreo	Tiempo de muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	Concentración <sup>1</sup> media $\pm$ desviación estándar, $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (n=6)	<sup>2</sup> CV (%)
Cd	IV	150	225	$1,7 \pm 0,1$	5,9
Co	IV	180	270	$8,3 \pm 0,6$	7,2
Cr	IV	30	45	$90,8 \pm 3,3$	3,6
Cu	IV	30	45	$95,8 \pm 4,2$	4,4
Fe	III	5	7,5	$1674,1 \pm 55,4$	3,3
Mn	II	15	22,5	$84,5 \pm 3,4$	4,0
Ni	IV	30	45	$143,4 \pm 6,4$	4,5
Pb	IV	120	180	$42,9 \pm 2,4$	5,6
Zn	II	15	22,5	$33,6 \pm 1,6$	4,8

<sup>1</sup>Las muestras para la determinación de cada metal (n=6) se tomaron al mismo tiempo y en las mismas condiciones: mismo caudal (1,5 L/min) y mismas características de proceso de soldadura.

<sup>2</sup>CV (coeficiente de variación)

La variable respuesta (% eficacia en la extracción) se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Eficacia en la Extracción} = \frac{[\text{Metal}]_{\text{determinada por el método propuesto}}}{[\text{Metal}]_{\text{determinada por el método oficial}}} \times 100$$

Los % de eficacia en la extracción obtenidos por duplicado y expresados como la media de los dos valores calculados obtenidos para cada experimento del diseño se muestran en las Tablas XIV (1-9).

Tabla XIV (1).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^6 \times 3/16$  para las seis variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del cadmio*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	% Eficacia en la Extracción
1	3	0	20	0,5	6	5	65,7
2	0	0	20	5	6	5	20,2
3	0	0	20	0,5	3	2	6,1
4	0	0	70	5	6	2	30,1
5	0	3	70	5	3	5	62,7
6	1,5	1,5	45	2,75	4,5	3,5	97,5
7	3	0	70	0,5	3	2	77,3
8	3	3	70	0,5	6	5	91,2
9	3	3	20	5	6	2	95,5
10	0	3	70	0,5	6	2	47,6
11	3	3	20	5	3	2	74,4
12	0	3	20	0,5	3	5	29,5
13	3	0	70	5	3	5	100,0

Tabla XIV (2).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^6 \times 3/16$  para las seis variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del cobalto*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	% Eficacia en la Extracción
1	0	3	20	0,5	3	5	9,1
2	3	3	70	0,5	6	5	79,0
3	3	0	20	0,5	6	5	50,9
4	0	3	70	5	3	5	55,3
5	0	0	20	0,5	3	2	0
6	0	0	20	5	6	5	7,7
7	3	0	70	5	3	5	96,2
8	1,5	1,5	45	2,75	4,5	3,5	53,0
9	3	3	20	5	6	2	75,1
10	0	0	70	5	6	2	23,5
11	3	3	20	5	3	2	57,4
12	0	3	70	0,5	6	2	44,6
13	3	0	70	0,5	3	2	59,3



Tabla XIV(3).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  para las seis variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del cromo*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	% Eficacia en la Extracción
1	1,5	1,5	45	2,75	4,5	3,5	37,3
2	3	0	20	0,5	6	5	11,7
3	0	3	70	5	3	5	65,3
4	3	3	70	0,5	6	5	64,1
5	0	0	20	0,5	3	2	0
6	0	0	20	5	6	5	0
7	3	0	70	0,5	3	2	44,5
8	3	0	70	5	3	5	89,4
9	0	3	20	0,5	3	5	0
10	3	3	20	5	3	2	58,1
11	0	3	70	0,5	6	2	29,3
12	3	3	20	5	6	2	76,0
13	0	0	70	5	6	2	0

Tabla XIV(4).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  para las seis variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del cobre*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	% Eficacia en la Extracción
1	0	3	70	5	3	5	82,6
2	0	0	20	0,5	3	2	0
3	1,5	1,5	45	2,75	4,5	3,5	79,2
4	0	3	20	0,5	3	5	20,0
5	3	3	70	0,5	6	5	83,7
6	3	3	20	5	3	2	61,0
7	0	0	20	5	6	5	9,4
8	3	0	20	0,5	6	5	62,2
9	0	0	70	5	6	2	18,8
10	3	0	70	5	3	5	101,2
11	3	0	70	0,5	3	2	66,5
12	3	3	20	5	6	2	90,2
13	0	3	70	0,5	6	2	67,8

Tabla XIV(5).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  para las seis variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del hierro*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	% Eficacia en la Extracción
1	3	3	70	0,5	6	5	91,1
2	3	3	20	5	6	2	89,8
3	3	0	70	5	3	5	100,5
4	0	3	70	0,5	6	2	61,0
5	3	3	20	5	3	2	58,4
6	3	0	70	0,5	3	2	59,1
7	0	0	20	0,5	3	2	0
8	3	0	20	0,5	6	5	50,4
9	0	0	20	5	6	5	0
10	0	3	20	0,5	3	5	0
11	0	0	70	5	6	2	11,3
12	0	3	70	5	3	5	68,5
13	1,5	1,5	45	2,75	4,5	3,5	74,3

Tabla XIV(6).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  para las seis variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del manganeso*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	% Eficacia en la Extracción
1	0	3	20	0,5	3	5	26,1
2	0	0	70	5	6	2	23,3
3	3	0	20	0,5	6	5	61,5
4	0	0	20	5	6	5	15,0
5	0	3	70	5	3	5	71,2
6	0	3	70	0,5	6	2	65,0
7	0	0	20	0,5	3	2	0
8	1,5	1,5	45	2,75	4,5	3,5	65,7
9	3	3	20	5	6	2	85,4
10	3	0	70	5	3	5	96,4
11	3	3	70	0,5	6	5	79,7
12	3	3	20	5	3	2	58,8
13	3	0	70	0,5	3	2	60,1

Tabla XIV(7).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  para las seis variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del níquel*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	% Eficacia en la Extracción
1	3	0	70	5	3	5	95,0
2	3	3	70	0,5	6	5	70,5
3	3	3	20	5	3	2	60,7
4	3	0	70	0,5	3	2	50,3
5	1,5	1,5	45	2,75	4,5	3,5	40,2
6	0	0	20	5	6	5	0
7	0	0	20	0,5	3	2	0
8	0	0	70	5	6	2	0
9	3	0	20	0,5	6	5	37,3
10	0	3	20	0,5	3	5	0
11	3	3	20	5	6	2	70,5
12	0	3	70	0,5	6	2	12,3
13	0	3	70	5	3	5	46,4

Tabla XIV(8).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  para las seis variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del plomo*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	% Eficacia en la Extracción
1	3	3	20	5	3	2	65,1
2	0	3	70	5	3	5	71,7
3	0	3	20	0,5	3	5	21,0
4	0	0	20	0,5	3	2	0
5	0	3	70	0,5	6	2	66,7
6	0	0	20	5	6	5	0
7	0	0	70	5	6	2	19,2
8	3	0	70	0,5	3	2	66,7
9	3	0	20	0,5	6	5	61,3
10	3	3	20	5	6	2	89,4
11	1,5	1,5	45	2,75	4,5	3,5	84,1
12	3	0	70	5	3	5	98,7
13	3	3	70	0,5	6	5	86,5

Tabla XIV(9).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  para las seis variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del cinc*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	% Eficacia en la Extracción
1	0	0	20	0,5	3	2	0
2	0	3	20	0,5	3	5	34,0
3	3	0	20	0,5	6	5	63,7
4	0	0	20	5	6	5	11,2
5	0	0	70	5	6	2	20,1
6	0	3	70	5	3	5	60,7
7	3	3	70	0,5	6	5	89,2
8	1,5	1,5	45	2,75	4,5	3,5	90,9
9	3	3	20	5	6	2	88,5
10	3	0	70	5	3	5	98,2
11	0	3	70	0,5	6	2	64,8
12	3	3	20	5	3	2	69,1
13	3	0	70	0,5	3	2	76,9

Una vez obtenidos los datos experimentales se procede al análisis correspondiente. En principio es necesario conocer qué variables son significativas, es decir aquellas que van a tener una gran influencia sobre el % Eficacia en la Extracción de los metales, para ello se recurre a la Carta Pareto estandarizada (Figuras 29 (I-IX)). En este gráfico se representa el valor absoluto del efecto estimado de cada variable en para cada proceso mediante barras, lo que ayuda a estudiar la importancia relativa de las mismas.

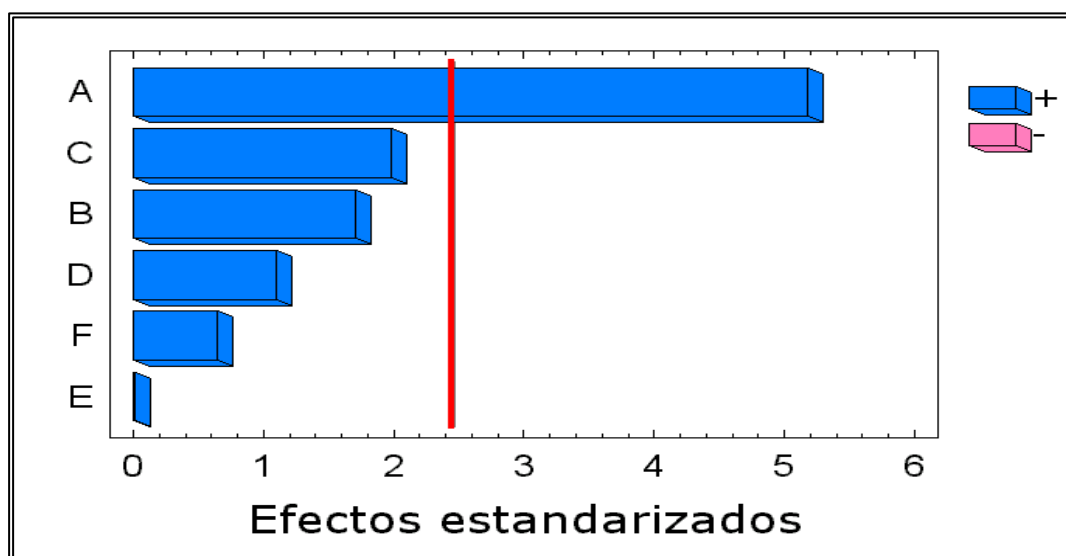


Figura 29(I).- Lixiviación del cadmio. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante

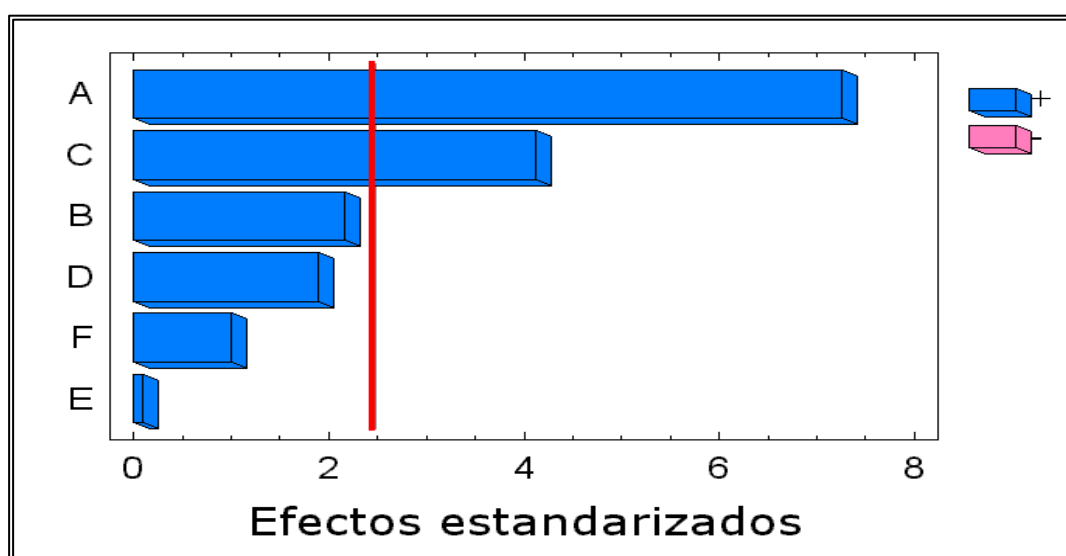


Figura 29 (II).- Lixiviación del cobalto. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante

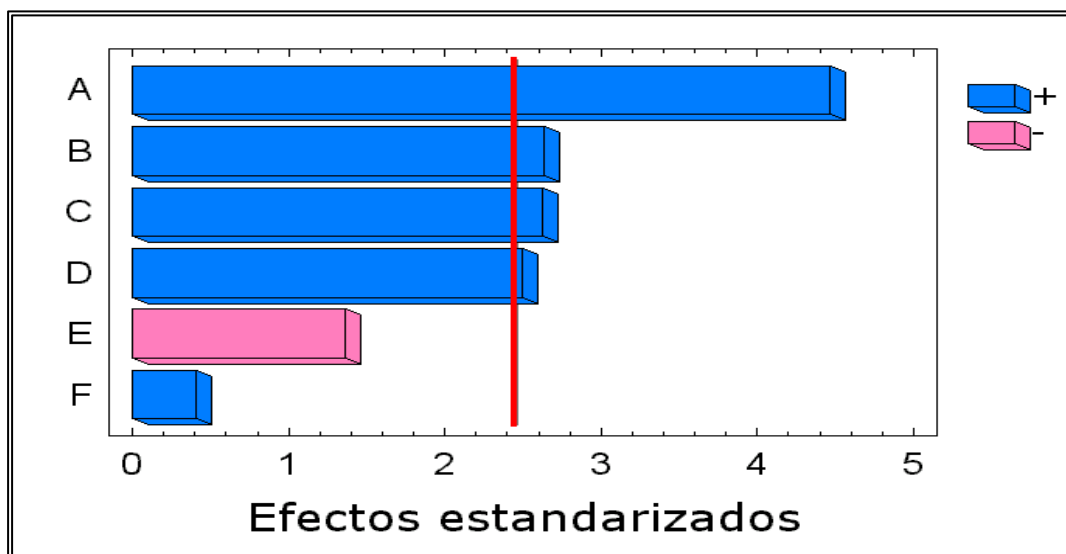


Figura 29(III).- Lixiviación del cromo. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante

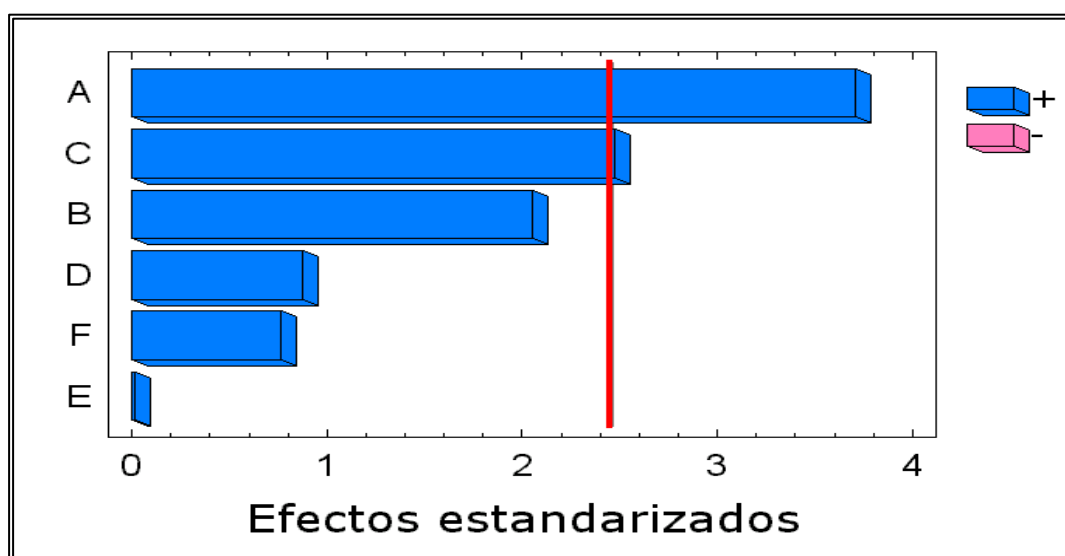


Figura 29(IV).- Lixiviación del cobre. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante

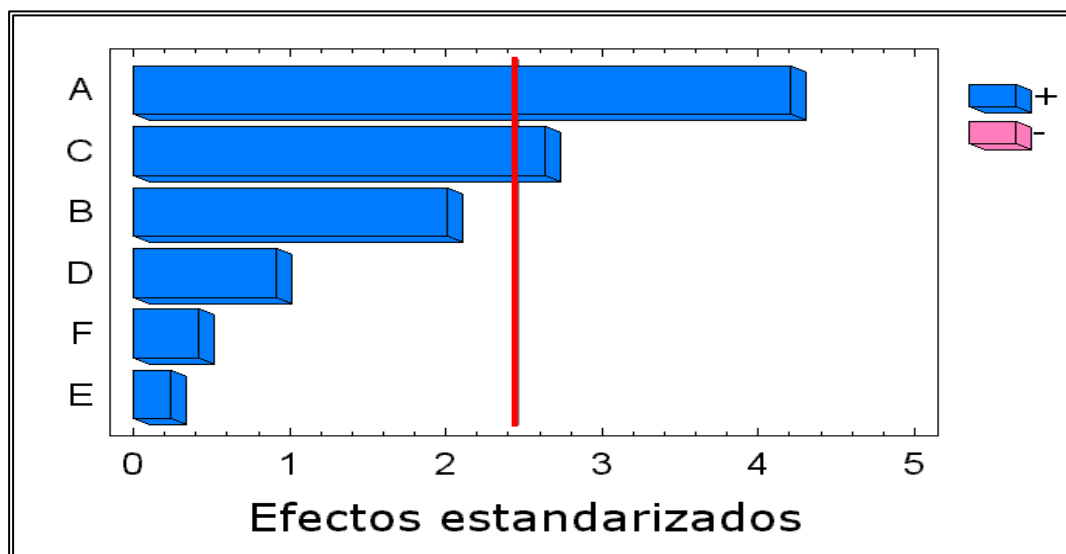


Figura 29(V).- Lixiviación del hierro. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante

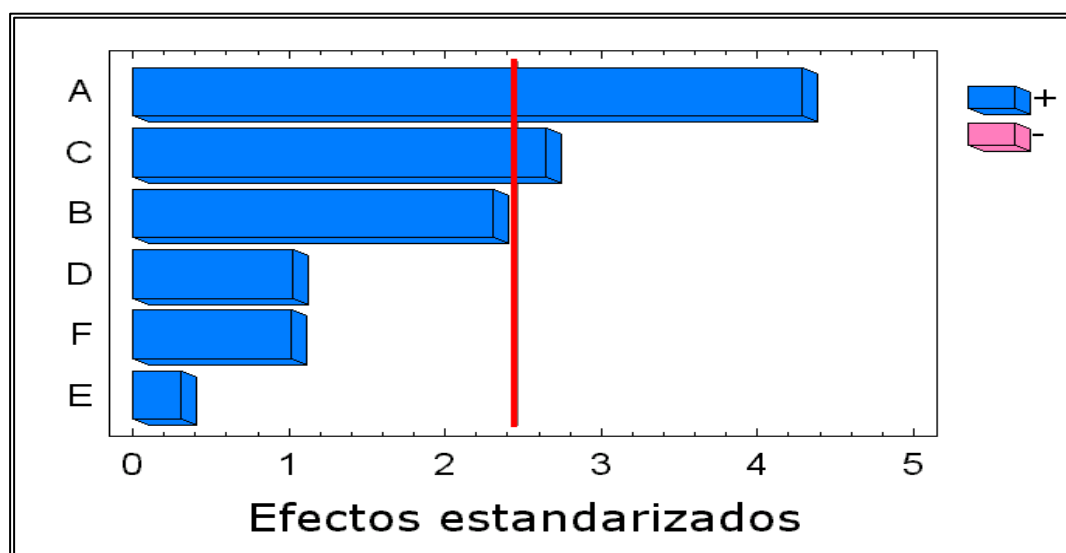


Figura 29(VI).- Lixiviación del manganeso. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante

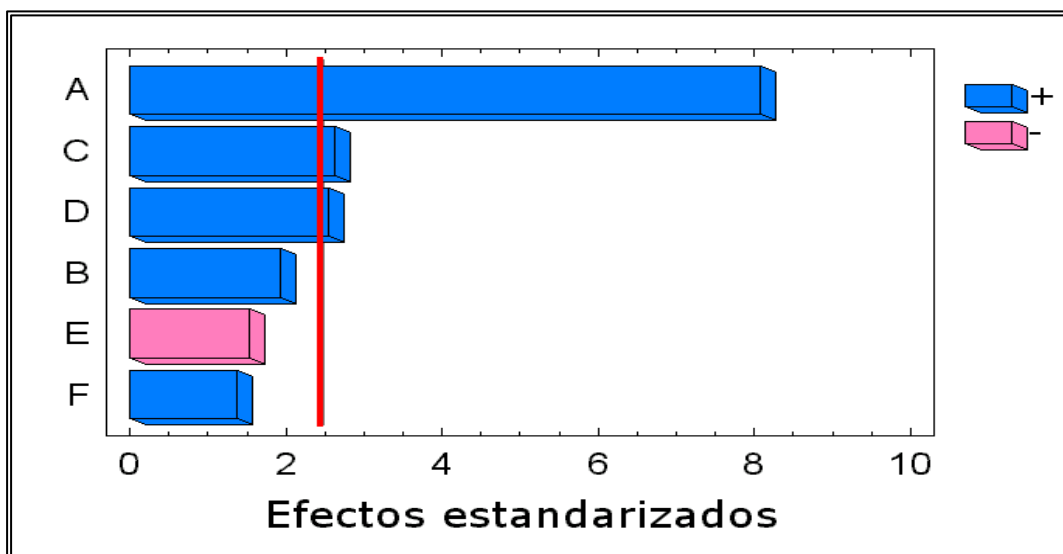


Figura 29(VII).- Lixiviación del níquel. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante

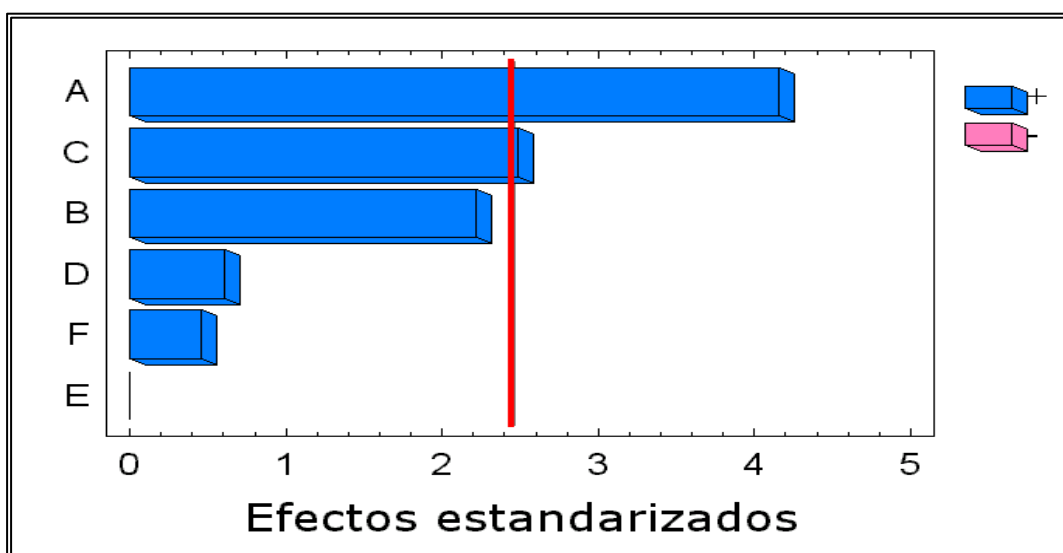


Figura 29(VIII).- Lixiviación del plomo. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante.



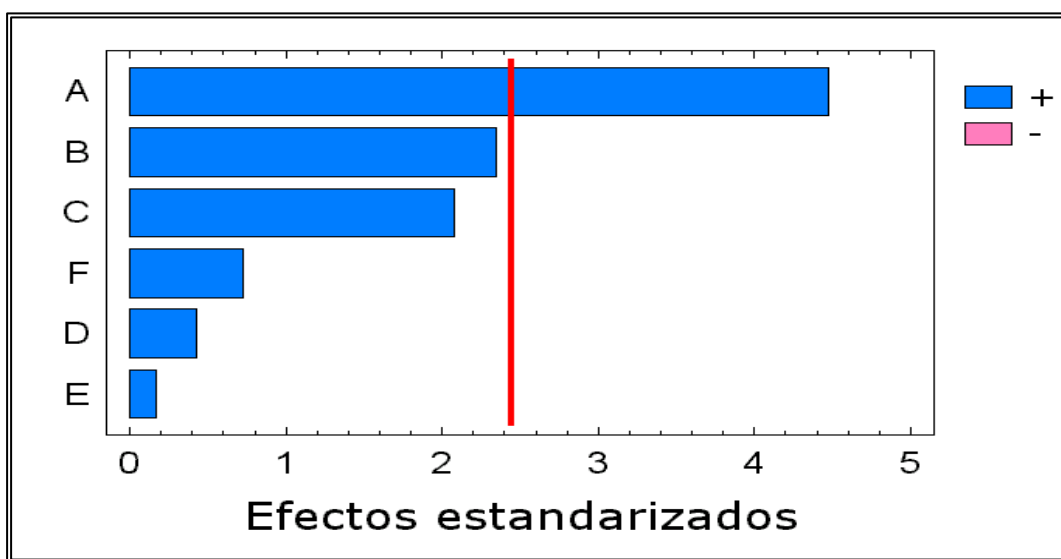


Figura 29(IX).- Lixiviación del cinc. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante

El valor de los efectos estimados para cada una de las variables se indican en la Tabla XV.

Tabla XV.- Efectos Estimados de cada una de las Variables Estudiadas

VARIABLE	EFECTO ESTIMADO								
	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
[HNO <sub>3</sub> ]	51,3	46,3	41,5	44,4	51,4	40,2	54,3	48,2	47,1
[HCl]	16,9	13,8	24,5	24,5	24,6	21,7	13,0	25,8	24,7
Temperatura de lixiviación	19,6	26,3	24,5	29,6	32,2	24,8	17,7	28,8	21,9
Tiempo de sonicación	10,9	12,0	23,2	10,5	11,2	9,6	17,0	7,0	4,5
Caudal de lixiviación	0,05	0,58	-12,7	0,13	2,9	2,9	-10,3	-0,02	1,8
Volumen de lixiviante	6,4	6,4	3,8	9,1	5,2	9,6	9,2	5,4	7,6

En las Figuras 30(I-IX) se representa mediante líneas la influencia de los efectos principales en la etapa de lixiviación del filtro de captación de aire para la determinación de los metales. Las líneas indican la magnitud y el signo de la variación de % Eficacia en la Extracción con el nivel del factor (desde el nivel alto hasta el nivel bajo). La pendiente positiva indica que la variación es creciente, es decir, mayor eficacia de extracción en el nivel alto del factor, y en contraposición, la pendiente negativa indica una variación decreciente, mayor eficacia en la extracción en el nivel bajo del factor.

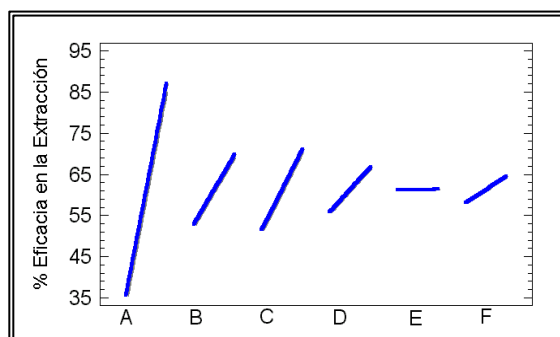
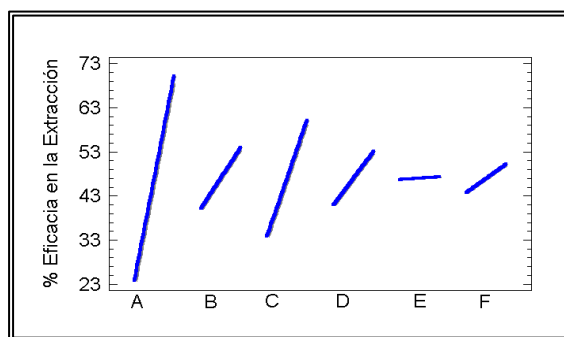


Fig. 30(I).- Lixiviación del cadmio      Fig. 30(II).- Lixiviación del cobalto  
Representación de los efectos principales de las seis variables que afectan al proceso de extracción. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante

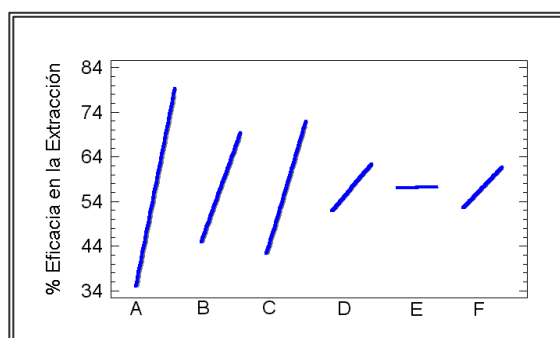
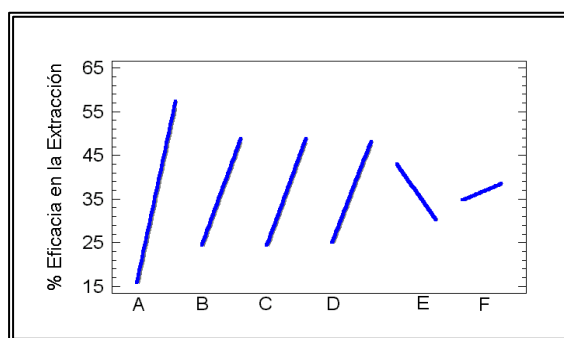


Fig. 30(III).- Lixiviación del cromo      Fig. 30(IV).- Lixiviación del cobre  
Representación de los efectos principales de las seis variables que afectan al proceso de extracción. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante

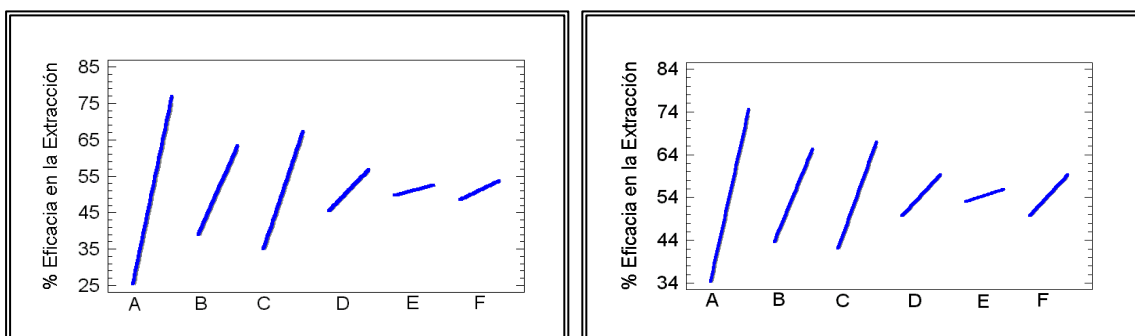


Fig. 30(V).- Lixiviación del hierro      Fig.30(VI).-Lixiviación del manganeso  
Representación de los efectos principales de las seis variables que afectan al proceso de extracción. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante

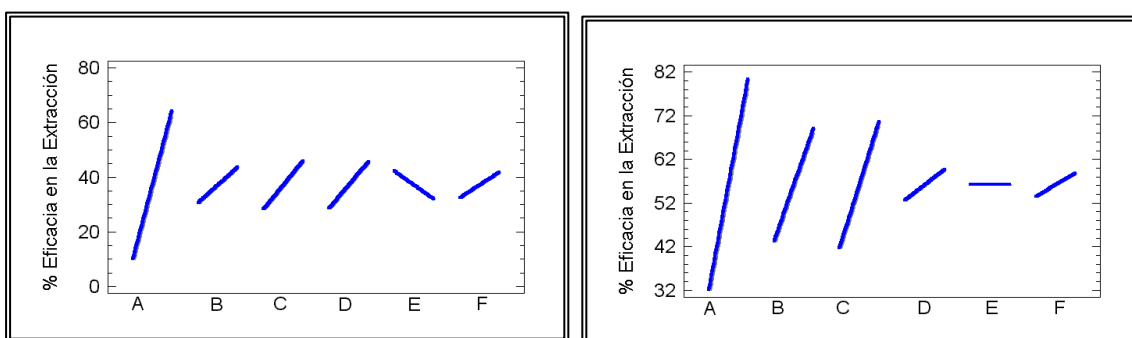


Fig. 30(VII).- Lixiviación del níquel      Fig. 30(VIII).- Lixiviación del plomo  
Representación de los efectos principales de las seis variables que afectan al proceso de extracción. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante

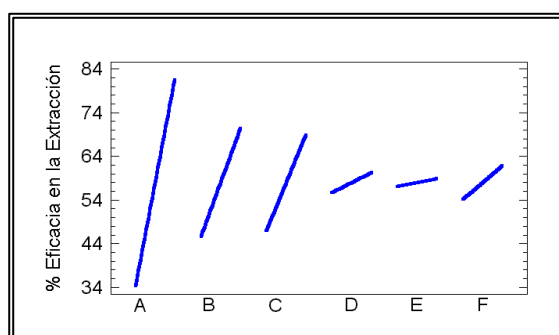


Figura 30(IX).- Lixiviación del cinc

Representación de los efectos principales de las seis variables que afectan al proceso de extracción. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante

### 3.1.1. Conclusiones del diseño de screening (Plackett-Burman)

A partir de las cartas Pareto (Figuras 29 (I-IX)) y de la representación de los efectos principales (Figuras 30 (I-IX)) se establecen las siguientes conclusiones.

En función de cada metal:

\* Cadmio: La concentración de  $\text{HNO}_3$  es la variable estadísticamente significativa en este sistema con un efecto estimado de 51,3. Así, se observa que cuanto mayor es su concentración mayor es el % de extracción de cadmio. Las demás variables presentan efectos estimados positivos y tienen una mayor o menor influencia sobre la extracción, pero sin superar el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 29(I)).

\* Cobalto: La concentración de  $\text{HNO}_3$  y la temperatura de lixiviación son las variables estadísticamente significativas. Siendo la concentración de  $\text{HNO}_3$  la variable de mayor efecto estimado (46,3). La temperatura es una variable que también favorece la lixiviación del cobalto de la muestra puesto que su efecto estimado adopta un valor de 26,3. Las demás variables presentan efectos estimados positivos y tienen una mayor o menor influencia sobre la extracción, pero sin superar el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 29(II)).

\* Cromo: La concentración de  $\text{HNO}_3$ , la concentración de  $\text{HCl}$ , la temperatura de lixiviación y el tiempo de sonicación son las variables estadísticamente significativas. Siendo la concentración de  $\text{HNO}_3$  la variable de mayor efecto estimado (41,5). La concentración de  $\text{HCl}$  y la temperatura son variables que también favorecen el proceso de lixiviación del cromo de la muestra puesto que su efecto estimado adopta un valor de 24,5. Lo mismo ocurre con el tiempo de sonicación, el cual presenta un efecto estimado de 23,2. El caudal de lixiviación presenta un efecto estimado negativo y el volumen de lixiviante positivo, aunque ambas variables no superan el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 29(III)).

\* Cobre: La concentración de  $\text{HNO}_3$  y la temperatura de lixiviación son las variables estadísticamente significativas. Siendo la concentración de  $\text{HNO}_3$  la variable de mayor efecto estimado (44,4). La temperatura es una variable que también favorece la lixiviación del cobre de la muestra puesto que su efecto estimado adopta un valor de 29,6. Las demás variables presentan efectos estimados positivos y tienen una mayor o menor influencia sobre la extracción, pero sin superar el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 29(IV)).

\* Hierro: La concentración de  $\text{HNO}_3$  y la temperatura de lixiviación son las variables estadísticamente significativas. Siendo la concentración de  $\text{HNO}_3$  la variable de mayor efecto estimado (51,4). La temperatura es una variable que también favorece la lixiviación del hierro de la muestra puesto que su efecto estimado adopta un valor de 32,2. Las demás variables presentan efectos estimados positivos y tienen una mayor o menor influencia sobre la extracción, pero sin superar el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 29(V)).

\* Manganeso: La concentración de  $\text{HNO}_3$  y la temperatura de lixiviación son las variables estadísticamente significativas. Siendo la concentración de  $\text{HNO}_3$  la variable de mayor efecto estimado (40,2). La temperatura es una variable que también favorece la lixiviación del manganeso de la muestra puesto que su efecto estimado adopta un valor de 24,8. Las demás variables presentan efectos estimados positivos y tienen una mayor o menor influencia sobre la extracción, pero sin superar el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 29(VI)).

\* Níquel: La concentración de  $\text{HNO}_3$ , la temperatura de lixiviación y el tiempo de sonicación son las variables estadísticamente significativas. En el caso de la concentración de  $\text{HNO}_3$ , variable de mayor efecto estimado (54,3). La temperatura es una variable que también mejora la lixiviación de la muestra puesto que su efecto estimado adopta un valor de 17,7. Otra variable que también favorece la lixiviación y es estadísticamente significativa es el tiempo de sonicación (efecto estimado = 17,0). Las demás variables tienen

una mayor o menor influencia sobre la extracción, como se observa en la Carta Pareto (Fig. 29(VII)), pero sin superar el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical). De esta manera, se observa que el efecto estimado del caudal de lixiviación es negativo, y la concentración de ácido clorhídrico y el volumen de lixivante presentan un efecto estimado positivo.

\* Plomo: La concentración de  $\text{HNO}_3$  y la temperatura de lixiviación son las variables estadísticamente significativas. Siendo la concentración de  $\text{HNO}_3$  la variable de mayor efecto estimado (48,2). La temperatura es una variable que también favorece la lixiviación del plomo de la muestra puesto que su efecto estimado adopta un valor de 28,8. Las demás variables presentan efectos estimados positivos y tienen una mayor o menor influencia sobre la extracción, pero sin superar el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 29(VIII)). En el caso del caudal de lixiviación, el efecto estimado es negativo, pero éste presenta un valor muy pequeño (-0,02).

\* Cinc: La concentración de  $\text{HNO}_3$  es la variable estadísticamente significativa con un efecto estimado de 47,1. Así, se observa que cuanto mayor es su concentración mayor es el % de extracción de cinc. Las demás variables presentan efectos estimados positivos y tienen una mayor o menor influencia sobre la extracción, pero sin superar el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 29(IX)).

En función de cada variable:

\* Concentración de ácido nítrico: En todos los casos la concentración de  $\text{HNO}_3$  es una variable estadísticamente significativa con efecto estimado positivo. Esto se debe a su efecto oxidante que mejora el proceso de lixiviación.

\* Concentración de ácido clorhídrico: Es una variable estadísticamente significativa con efecto estimado positivo para la lixiviación del cromo. Para la disolución de los demás óxidos metálicos no es significativa, aunque su efecto estimado es positivo.

\* Temperatura de lixiviación: Es una variable estadísticamente significativa con efecto estimado positivo para la lixiviación del cobalto, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel y plomo. Para el cadmio y el cinc no es significativa, aunque su efecto estimado es positivo, ya que la temperatura favorece la disolución.

\* Tiempo de sonicación: Es una variable estadísticamente significativa con efecto estimado positivo para la lixiviación del cromo y níquel, para los demás no es significativa, aunque su efecto estimado es positivo. Tal y como indican los resultados, cuanto más tiempo permanezca la muestra bajo la acción de la energía de ultrasonidos mayor contacto se produce entre la muestra y la disolución lixivante y por tanto se logra una mayor eficacia en la extracción. Sin embargo, tiempos de sonicación elevados suponen elevados tiempos de análisis y por lo tanto una reducción de la frecuencia de muestreo.

\* Caudal de lixiviación: En ninguno de los casos es una variable estadísticamente significativa. Para el cadmio, cobalto, cobre, hierro, manganeso y cinc presenta un efecto estimado positivo, mientras que para cromo y níquel el efecto estimado del caudal de lixiviación es negativo, lo que indica que la eficacia de la extracción es inversamente proporcional a dicho factor. En el caso del plomo el efecto estimado también es negativo, pero presenta un valor muy pequeño (-0,02), lo cual indica que prácticamente no influye en el proceso de lixiviación del óxido de plomo.

\* Volumen de lixivante: En ninguno de los casos es una variable estadísticamente significativa y siempre presenta un efecto estimado positivo, lo que indica que la eficacia de la extracción es directamente proporcional a dicho factor.

Debido a que el diseño factorial de Plackett-Burman no permite la evaluación directa de los términos de interacción entre dos o más factores, se eliminaron en cada caso del sistema aquellos factores que eran considerados originalmente, pero que no parecían tener influencia sobre el mismo:

- *Cadmio*: concentración de HCl, temperatura de lixiviación, tiempo de sonicación, caudal de lixiviación, volumen de lixivante.

- *Cobalto*: concentración de HCl, tiempo de sonicación, caudal de lixiviación y volumen de lixivante.
- *Cromo*: caudal de lixiviación y volumen de lixivante.
- *Cobre*: concentración de HCl, tiempo de sonicación, caudal de lixiviación y volumen de lixivante.
- *Hierro*: concentración de HCl, tiempo de sonicación, caudal de lixiviación y volumen de lixivante.
- *Manganeso*: concentración de HCl, tiempo de sonicación, caudal de lixiviación y volumen de lixivante.
- *Níquel*: concentración de HCl, caudal de lixiviación y volumen de lixivante.
- *Plomo*: concentración de HCl, tiempo de sonicación, caudal de lixiviación y volumen de lixivante.
- *Cinc*: concentración de HCl, temperatura de lixiviación, tiempo de sonicación, caudal de lixiviación, volumen de lixivante.

Así, se reevaluó el modelo ahora reducido, pudiéndose considerar las interacciones de segundo orden. La Figuras 31(I-IX) recogen los resultados obtenidos. Como se muestra en estas figuras, ninguna interacción de segundo orden es estadísticamente significativa, por lo que se puede variar el valor de una de estas variables sin que se vea afectado el valor de cualquier otra.

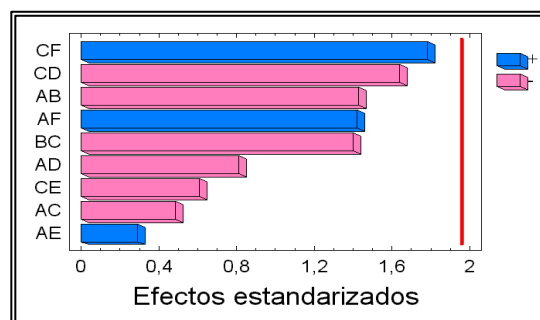
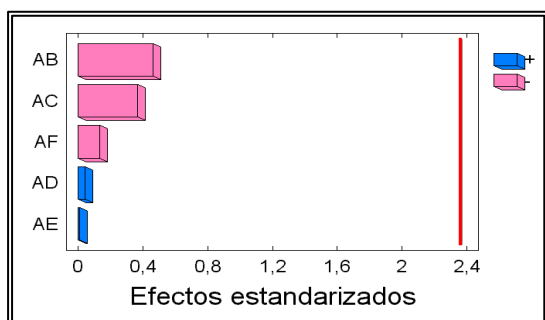


Fig. 31(I).- Lixiviación del cadmio

Fig. 31(II).- Lixiviación del cobalto

Carta Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [HNO<sub>3</sub>]; B, [HCl]; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante



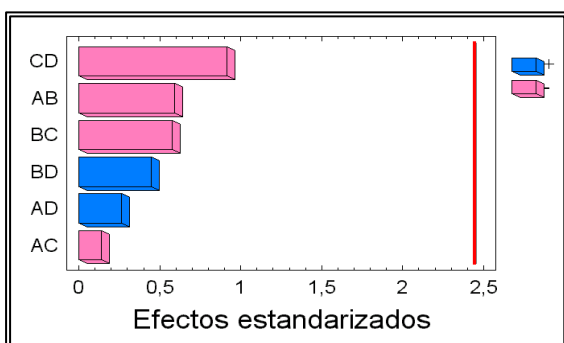


Fig. 31(III).- Lixiviación del cromo

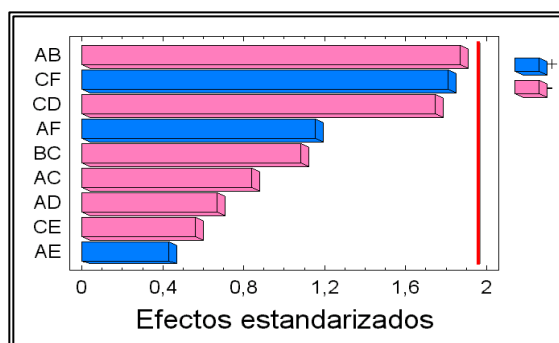


Fig. 31(IV).- Lixiviación del cobre

Carta Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [HNO<sub>3</sub>]; B, [HCl]; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante

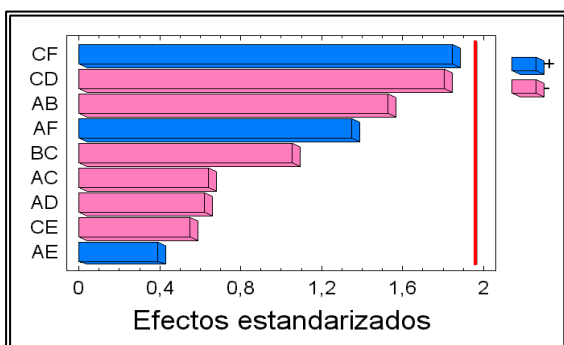


Fig. 31(V).- Lixiviación del hierro

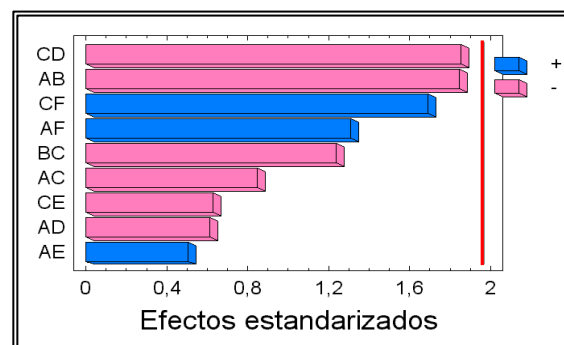


Fig. 31(VI).-Lixiviación del manganeso

Carta Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [HNO<sub>3</sub>]; B, [HCl]; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante

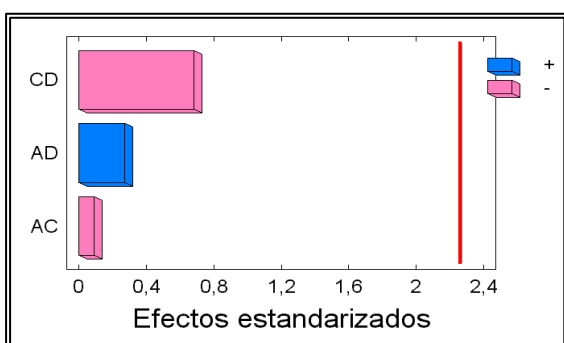


Fig. 31(VII).-Lixiviación del níquel

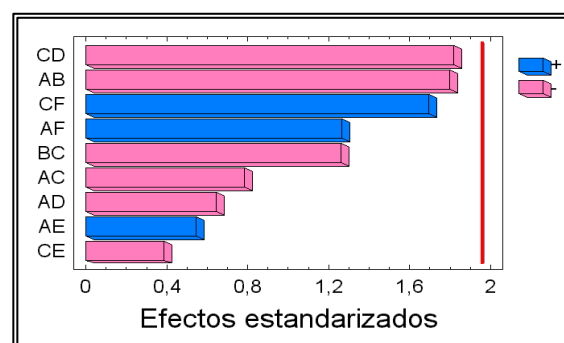


Fig. 31(VIII).- Lixiviación del plomo

Carta Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [HNO<sub>3</sub>]; B, [HCl]; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante

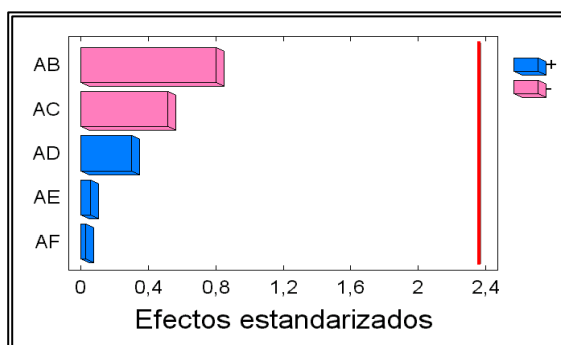


Fig. 31 (IX).- Lixiviación del cinc

Carta Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante

Todo lo concluido a partir de las Cartas Pareto se corrobora con las gráficas de superficie de respuesta que proporciona el análisis de Plackett-Burman. En estas gráficas se representa una variable frente a otra y mediante una superficie se indica la tendencia del sistema hacia el óptimo del proceso. De esta forma, se demuestra que en todos los casos la máxima eficacia en la extracción se obtiene para el valor máximo de concentración de ácido nítrico. Es decir, en estas superficies de respuesta se observa que manteniendo la concentración de  $\text{HNO}_3$  en su nivel más alto, la eficacia en la extracción es mayor cuanto mayor es la concentración de las variables con mayor peso estadístico en la lixiviación: concentración de ácido clorhídrico, temperatura de lixiviación y tiempo de sonicación (Figura 32 (I-XXXI)).

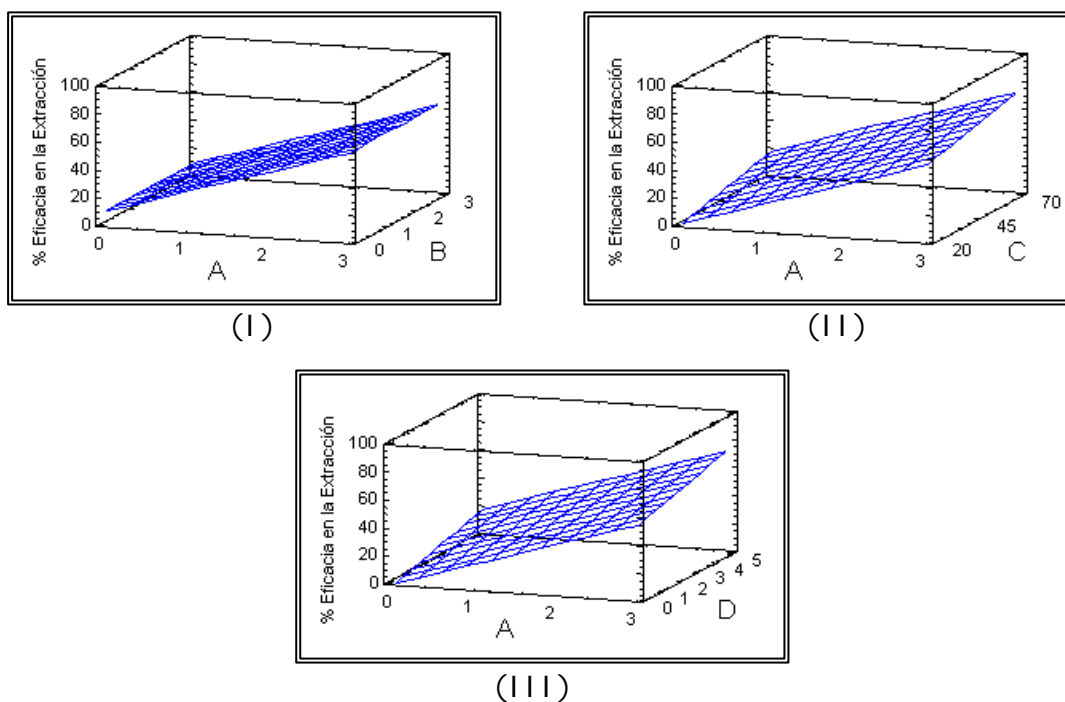


Figura 32 (I-III).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de cadmio: (I) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y concentración de  $\text{HCl}$  (B); (II) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y temperatura de lixiviación (C); (III) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y tiempo de sonicación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño.

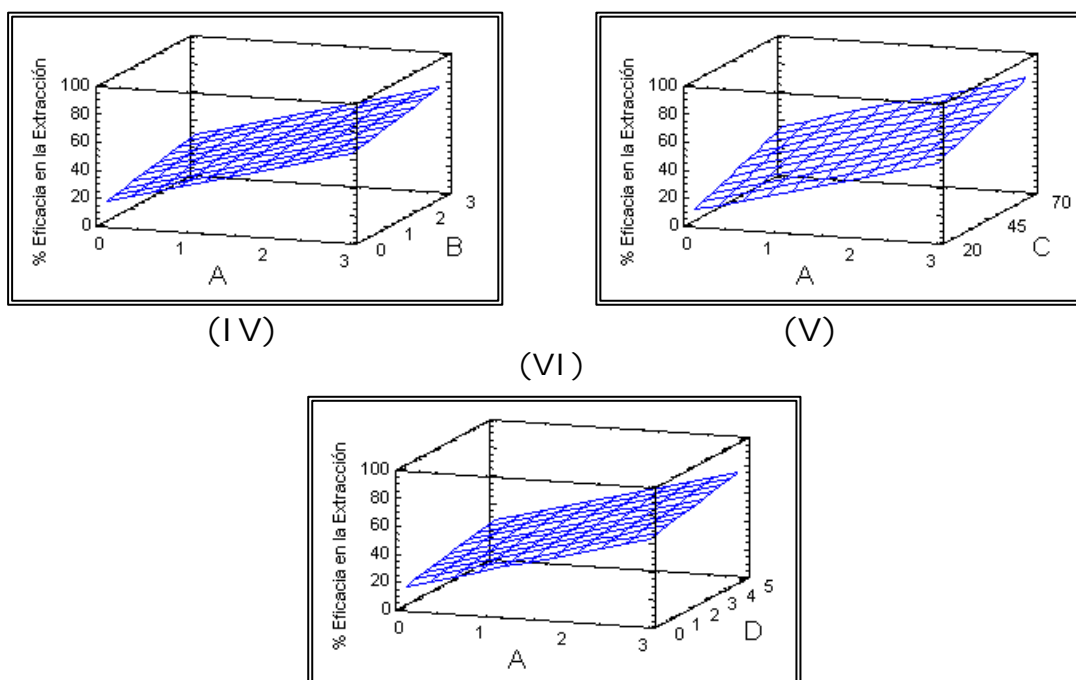
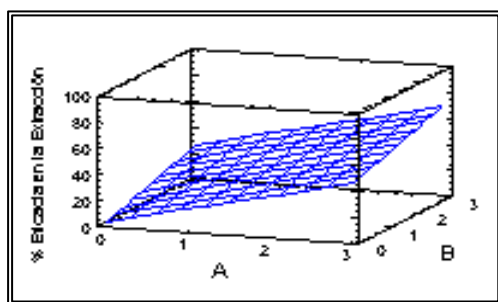
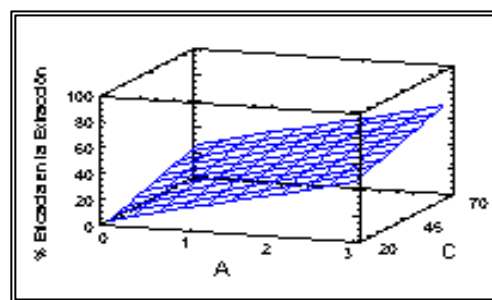


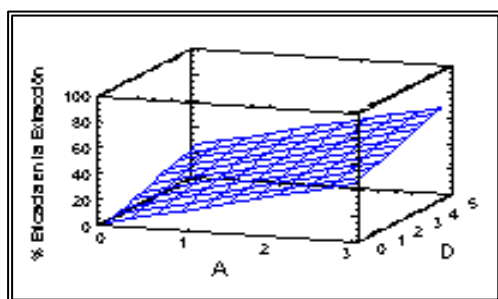
Figura 32 (IV-VI).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de cobalto: (IV) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y concentración de  $\text{HCl}$  (B); (V) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y temperatura de lixiviación (C); (VI) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y tiempo de sonicación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño.



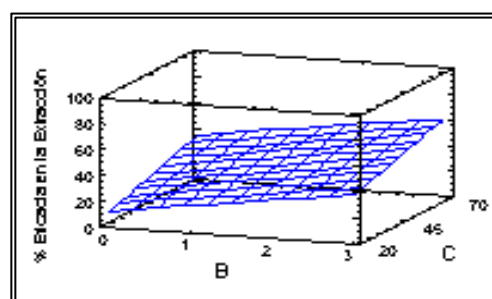
(VII)



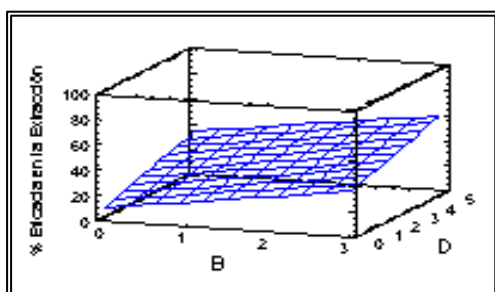
(VIII)



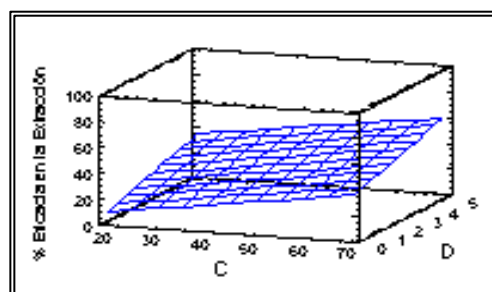
(IX)



(X)

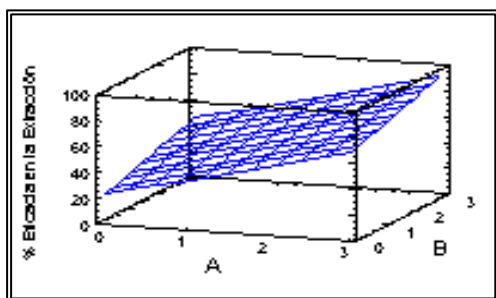


(XI)

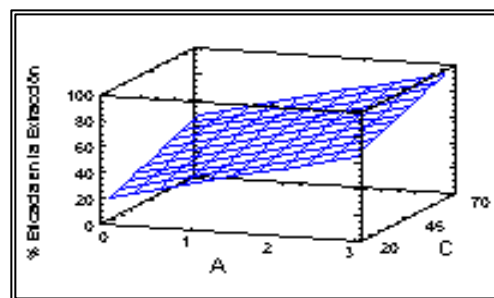


(XII)

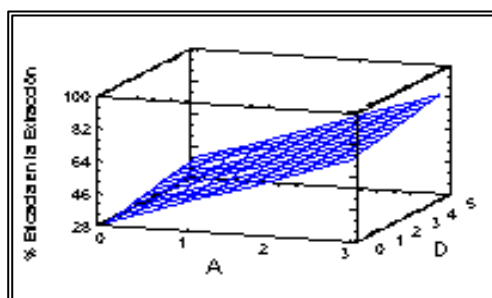
Figura 32 (VII-XII).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de cromo: (VII) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y concentración de HCl (B); (VIII) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y temperatura de lixiviación (C); (IX) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y tiempo de sonicación (D); (X) concentración de HCl (B) y temperatura de lixiviación (C); (XI) concentración de HCl (B) y Tiempo de sonicación (D); (XII) temperatura de lixiviación (C) y tiempo de sonicación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño.



(XIII)

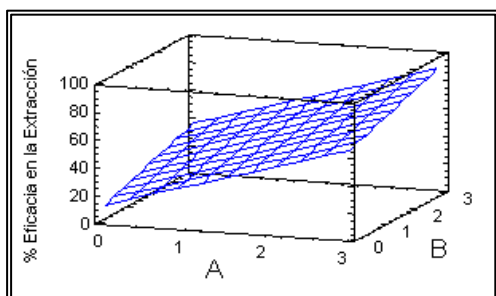


(XIV)

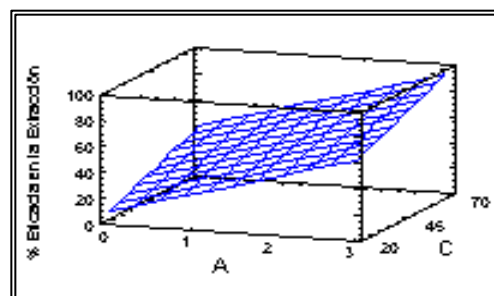


(XV)

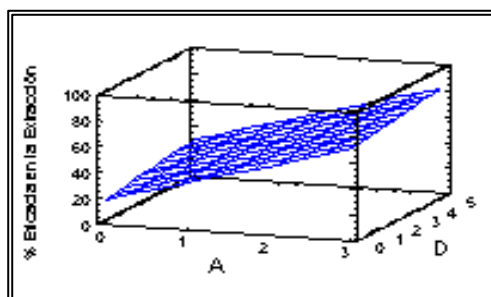
Figura 32 (XIII-XV).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de cobre: (XIII) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y concentración de HCl (B); (XIV) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y temperatura de lixiviación (C); (XV) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y tiempo de sonicación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño.



(XVI)



(XVII)



(XVIII)

Figura 32 (XVI-XVIII).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de hierro: (XVI) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y concentración de HCl (B); (XVII) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y temperatura de lixiviación (C); (XVIII) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y tiempo de sonicación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño.

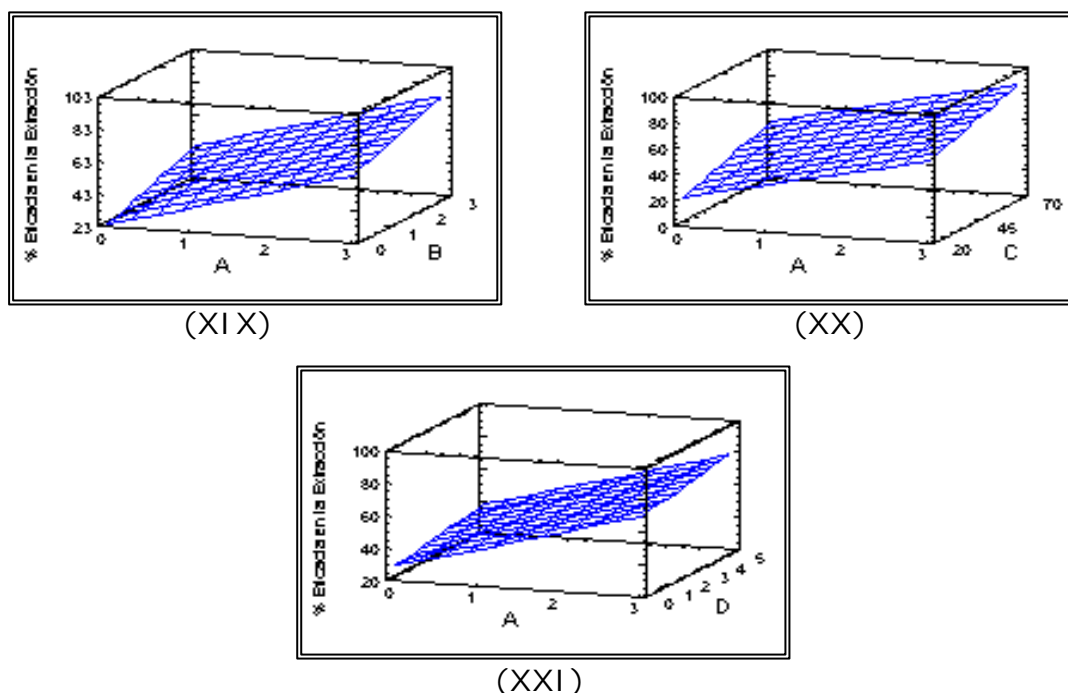


Figura 32 (XIX-XXI).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de manganeso: (XIX) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y concentración de  $\text{HCl}$  (B); (XX) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y temperatura de lixiviación (C); (XXI) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y tiempo de sonicación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño.

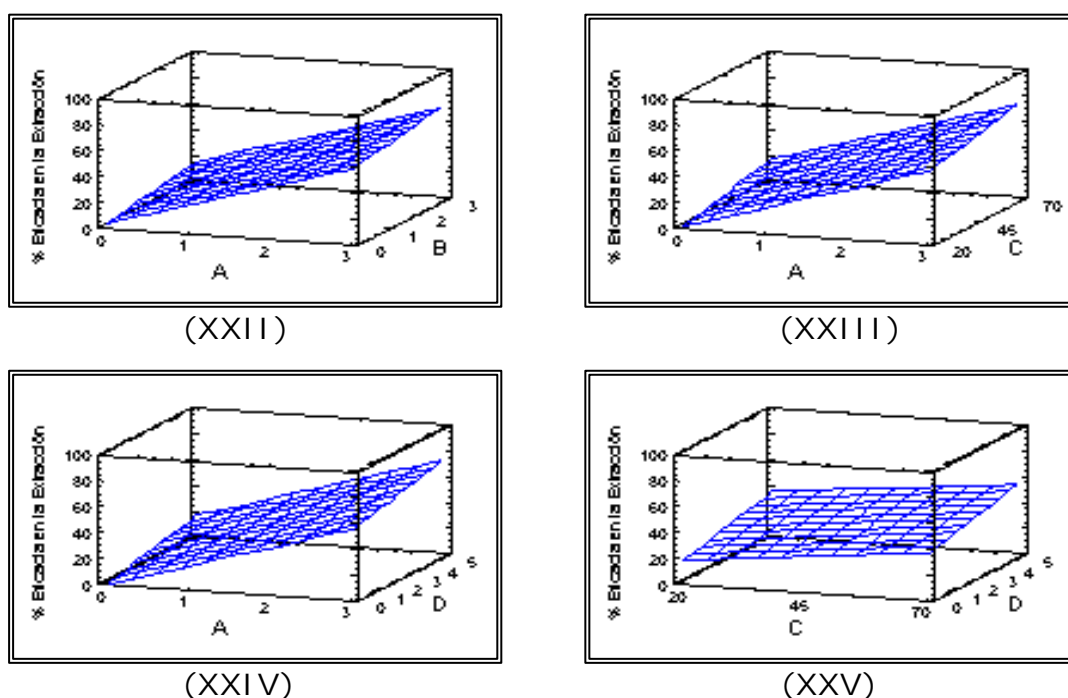
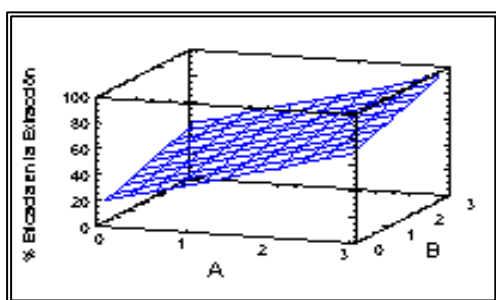
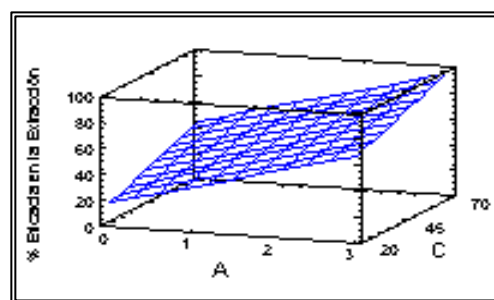


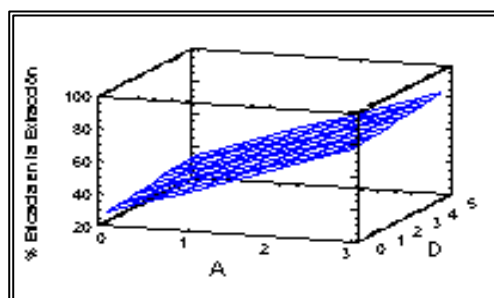
Figura 32 (XXII-XXV).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de níquel: (XXII) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y concentración de  $\text{HCl}$  (B); (XXIII) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y temperatura de lixiviación (C); (XXIV) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y tiempo de sonicación (D); (XXV) temperatura de lixiviación (C) y tiempo de sonicación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño.



(XXVI)

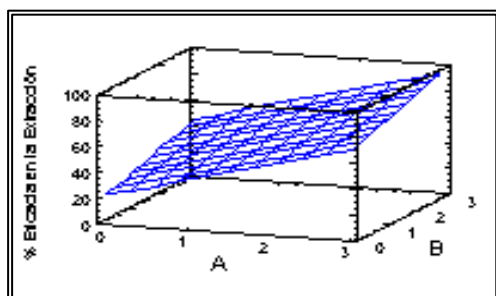


(XXVII)

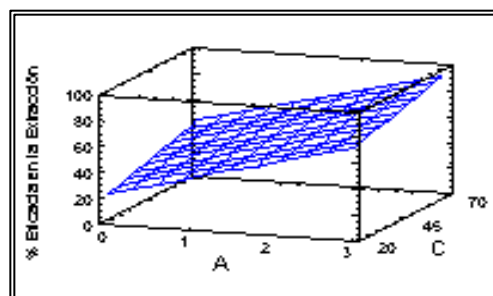


(XXVIII)

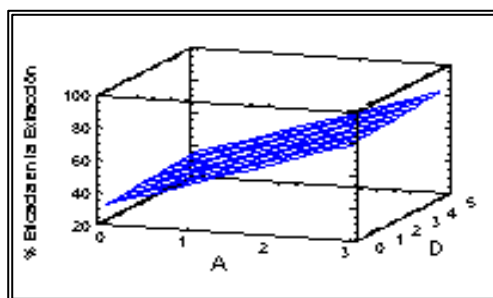
Figura 32 (XXVI-XXVIII).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de plomo: (XXVI) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y concentración de  $\text{HCl}$  (B); (XXVII) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y temperatura de lixiviación (C); (XXVIII) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y tiempo de sonicación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño.



(XXIX)



(XXX)



(XXXI)

Figura 32 (XXIX-XXXI).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de cinc: (XXIX) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y concentración de  $\text{HCl}$  (B); (XXX) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y temperatura de lixiviación (C); (XXXI) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y tiempo de sonicación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño.

Después de haber realizado el análisis de los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Plackett-Burman, los valores optimizados para cada una de las variables serían los recogidos en la Tabla XVI.

Tabla XVI.- Condiciones establecidas para cada variable según el diseño de Plackett-Burman

VARIABLE	VALORES ESTABLECIDOS POR EL DISEÑO								
	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
[HNO <sub>3</sub> ] (M)	3	3	3	3	3	3	3	3	3
[HCl] (M)	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Temperatura de lixiviación (° C)	70	70	70	70	70	70	70	70	70
Tiempo de sonicación (min)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Caudal de lixiviación (mL/min)	6	6	3	6	6	6	3	3	6
Volumen de lixivante (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5

### 3.2. Diseños de Superficie de Respuesta

Como los diseños de screening no proporcionan el valor óptimo de cada una de las variables que determinan el sistema, sino que este tipo de diseños indican las tendencias de cada una de ellas hacia el mismo, se procedió a utilizar un diseño factorial de superficie de respuesta.

Antes de realizar el diseño factorial de superficie de respuesta, se tuvo en cuenta lo siguiente para cada variable:

- *Volumen de lixivante*: En todos los casos el diseño de screening establece como óptimo 5 mL. Volúmenes mayores implicarían una mayor dilución, y por tanto, una disminución en la sensibilidad.
- *Caudal de lixivante*: El diseño de screening establece como óptimos 3 mL/min para el Cr, Ni y Pb, y 6 mL/min para el Cd, Co, Cu, Fe, Mn y Zn. La utilización de un caudal mayor o menor no implicaría ninguna



ventaja en cuanto a características analíticas de los métodos desarrollados.

- *Concentración de nítrico y de clorhídrico:* En el caso de estas concentraciones, se observa un efecto estimado positivo que indica que a mayor concentración se obtienen mejores resultados. La concentración de nítrico es una variable estadísticamente significativa en todos los casos, sin embargo, elevadas concentraciones de ácido podrían causar daños importantes en el nebulizador del espectrofotómetro de absorción atómica con llama. Además, si se tiene en cuenta el experimento N° 13 para el Cd, el n° 7 para el Co, el n° 10 para el Cu, el n° 3 para el Fe, el n° 10 para el Mn, el n° 1 para el Ni, el n° 12 para el Pb y el n° 10 para el Zn del diseño factorial de Plackett-Burman (para todos los metales excepto para el Cr), se obtienen % de eficacia en la extracción entre 95,0-101,2%. Por tanto, en estos casos, la disolución lixivante podría ser únicamente ácido nítrico 3 M.

Así, para el Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn, con el objetivo de afinar el valor óptimo del tiempo de sonicación y de la temperatura de lixiviación, se procedió a realizar un diseño factorial de superficie de respuesta. En la Tabla XVII se muestra el valor considerado como óptimo para las demás variables.

Tabla XVII.- Valores óptimos tomados para las variables no consideradas en el diseño factorial de superficie de respuesta para Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS							
	Cd	Co	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
[HNO <sub>3</sub> ] (M)	3	3	3	3	3	3	3	3
[HCl] (M)	0	0	0	0	0	0	0	0
Caudal de lixiviación (mL/min)	6	6	6	6	6	3	3	6
Volumen de lixivante (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5

En el caso del cromo, como en el diseño de Plackett-Burman el máximo % de eficacia en la extracción que se obtuvo fue del 89,4%, las variables consideradas para optimizar en el diseño factorial de superficie de respuesta fueron las que resultaron estadísticamente significativas en el diseño de Plackett-Burman: concentración de ácido nítrico, temperatura de lixiviación y tiempo de sonicación. En el caso de la concentración de HCl, se tomó como valor óptimo cero para determinar si sólo aumentando la concentración de ácido nítrico se conseguía extraer todo el cromo y así realizar menor número de experimentos. En la Tabla XVIII se muestra el valor considerado como óptimo para las demás variables.

Tabla XVIII.- Valores óptimos tomados para las variables no consideradas en el diseño factorial de superficie de respuesta para el Cr

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS
[HCl] (M)	0
Caudal de lixiviación (mL/min)	3
Volumen de lixivante (mL)	5

Para poder realizar un diseño de experimentos es necesario fijar un valor máximo y un valor mínimo para cada variable. La Tabla XIX expone los valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta para Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn, y la Tabla XX los valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta para el Cr.

Tabla XIX.- Valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta para Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn

VARIABLE	CLAVE	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
Temperatura de lixiviación	C	30 °C	80 °C
Tiempo de sonicación	D	3 min	9 min

Tabla XX.- Valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta para el Cr

VARIABLE	CLAVE	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
[HNO <sub>3</sub> ]	A	3	5
Temperatura de lixiviación	C	30 °C	80 °C
Tiempo de sonicación	D	3 min	9 min

Los valores máximo y mínimo establecidos para cada variable se han elegido en función de estudios previos y de los resultados obtenidos anteriormente en el diseño de screening.

La variable respuesta (% eficacia en la extracción) se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Eficacia en la Extracción} = \frac{[\text{Metal}]_{\text{determinada por el método propuesto}}}{[\text{Metal}]_{\text{determinada por el método oficial}}} \times 100$$

Para Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn, el diseño factorial aplicado de superficie de respuesta es un diseño central composicional  $2^2$  + estrella que implica realizar 10 experimentos (Statgraphics Plus 5.1). Las características del diseño son las siguientes:

- Tipo de Diseño: Superficie de respuesta
- Nombre del Diseño: Central Composicional  $2^2$  + estrella
- Características del diseño: ortogonal
- Número de factores experimentales: 2
- Puntos centrales: 2
- Número de experimentos: 10
- Error grados de libertad: 4
- Aleatorio: Si
- Distancia axial,  $\alpha = 1,07809$

Para el Cr, el diseño factorial aplicado de superficie de respuesta es un diseño central composicional  $2^3 +$  estrella que implica realizar 16 experimentos (Statgraphics Plus 5.1). Las características del diseño son las siguientes:

- Tipo de Diseño: Superficie de respuesta
- Nombre del Diseño: Central Composicional  $2^3 +$  estrella
- Características del diseño: ortogonal
- Número de factores experimentales: 3
- Puntos centrales: 2
- Número de experimentos: 16
- Error grados de libertad: 6
- Aleatorio: Si
- Distancia axial,  $\alpha = 1,28719$

Las Tablas XXI (1-9) muestran las matrices experimentales del diseño incluyendo la variable respuesta, % Eficacia en la Extracción (media obtenida al realizar cada experimento por duplicado).

Una vez obtenidos los resultados experimentales se introducen en cada diseño central composicional para obtener la información necesaria para obtener los valores óptimos de cada variable. Esta búsqueda se llevará acabo con ayuda de las superficies de respuesta estimadas para el conjunto de dos variables que se pueden ver en la Figura 34.

Tabla XXI (1).- Matriz del diseño central composicional  $2^2$  + estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del cadmio. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	55	6	100,0
2	28,0478	6	98,7
3	81,9522	6	100,0
4	30	3	98,7
5	55	6	100,0
6	55	9,23427	100,0
7	30	9	98,7
8	80	3	98,7
9	80	9	100,0
10	55	2,76573	100,0

Tabla XXI (2).- Matriz del diseño central composicional  $2^2$  + estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del cobalto. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	28,0478	6,0	72,4
2	80,0	3,0	90,2
3	30,0	3,0	60,7
4	80,0	9,0	100,1
5	55,0	9,23427	92,8
6	55,0	2,76573	78,6
7	30,0	9,0	80,4
8	55,0	6,0	83,3
9	81,9522	6,0	97,8
10	55,0	6,0	100,1

Tabla XXI (3).- Matriz del diseño central composicional  $2^3 +$  estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del cromo. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

Experimento	A	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	2,71281	55,0	6,0	82,5
2	3,0	80,0	3,0	86,1
3	4,0	87,1797	6,0	92,8
4	5,0	80,0	3,0	94,5
5	5,0	30,0	9,0	87,5
6	3,0	80,0	9,0	92,8
7	4,0	55,0	2,13843	84,3
8	5,28719	55,0	6,0	89,8
9	4,0	55,0	9,86157	87,5
10	4,0	22,8203	6,0	50,6
11	5,0	30,0	3,0	58,7
12	5,0	80,0	9,0	101,5
13	4,0	55,0	6,0	93,8
14	3,0	30,0	3,0	46,2
15	3,0	30,0	9,0	52,1
16	4,0	55,0	6,0	90,0

Tabla XXI (4).- Matriz del diseño central composicional  $2^2 +$  estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del cobre. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	81,9522	6	100,0
2	55	2,76573	88,6
3	28,0478	6	83,8
4	30	3	69,5
5	55	6	100,0
6	55	9,23427	100,0
7	80	3	96,1
8	80	9	100,0
9	30	9	92,1
10	55	6	100,0

Tabla XXI (5).- Matriz del diseño central composicional  $2^2 +$  estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del hierro. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	55,0	6,0	101,5
2	80,0	9,0	101,5
3	80,0	3,0	96,6
4	30,0	9,0	93,7
5	28,0478	6,0	84,2
6	55,0	6,0	101,5
7	30,0	3,0	69,4
8	55,0	2,76573	89,7
9	81,9522	6,0	99,9
10	55,0	9,23427	101,5

Tabla XXI (6).- Matriz del Diseño central composicional  $2^2 +$  estrella con sus correspondientes valores del % eficacia en la extracción de cada experimento para la lixiviación del manganeso. c, temperatura de lixiviación; d, tiempo de sonicación

Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	28,0478	6	81,6
2	55	2,76573	85,7
3	55	9,23427	99,8
4	30	3	65,5
5	80	3	96,2
6	81,9522	6	101,0
7	80	9	101,0
8	30	9	89,7
9	55	6	99,8
10	55	6	101,0

Tabla XXI (7).- Matriz del diseño central composicional  $2^2 +$  estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del níquel. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	81,9522	6,0	99,8
2	80,0	9,0	99,8
3	55,0	6,0	89,1
4	30,0	9,0	80,7
5	55,0	9,23427	93,7
6	80,0	3,0	91,5
7	55,0	2,76573	80,7
8	55,0	6,0	89,1
9	28,0478	6,0	76,6
10	30,0	3,0	60,3

Tabla XXI (8).- Matriz del diseño central composicional  $2^2 +$  estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del plomo. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	28,0478	6,0	92,1
2	55,0	9,23427	97,3
3	80,0	9,0	100,7
4	55,0	6,0	100,7
5	81,9522	6,0	100,7
6	30,0	9,0	95,7
7	55,0	6,0	99,3
8	30,0	3,0	90,8
9	80,0	3,0	95,7
10	55,0	2,76573	93,3



Tabla XXI (9).- Matriz del diseño central composicional  $2^2$  + estrella con sus correspondientes valores del % eficacia en la extracción de cada experimento para la lixiviación del cinc. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	30	3	83,7
2	55	6	100,4
3	80	9	99,0
4	80	3	99,0
5	81,9522	6	100,4
6	55	9,23427	99,0
7	55	2,76573	98,1
8	28,0478	6	89,3
9	30	9	93,5
10	55	6	99,0

### 3.2.1. Conclusiones del diseño de superficie de respuesta

El análisis de los resultados de la Tablas XXI (1-9) da lugar a las Cartas Pareto que se muestran en las Figura 33 (I-IX). Como se puede observar, la temperatura de lixiviación (C) en los casos del Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn es estadísticamente significativa, y está afectada por un signo positivo. El tiempo de sonicación (D), es una variable estadísticamente significativa sólo en los casos de Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni y Pb, y está afectada por un signo positivo. Para el cromo, la concentración de ácido nítrico es una variable estadísticamente significativa y afectada de signo positivo. También, al observar la Figura 33(I) se puede ver que en el caso del Cd, ninguna de las variables es estadísticamente significativa.

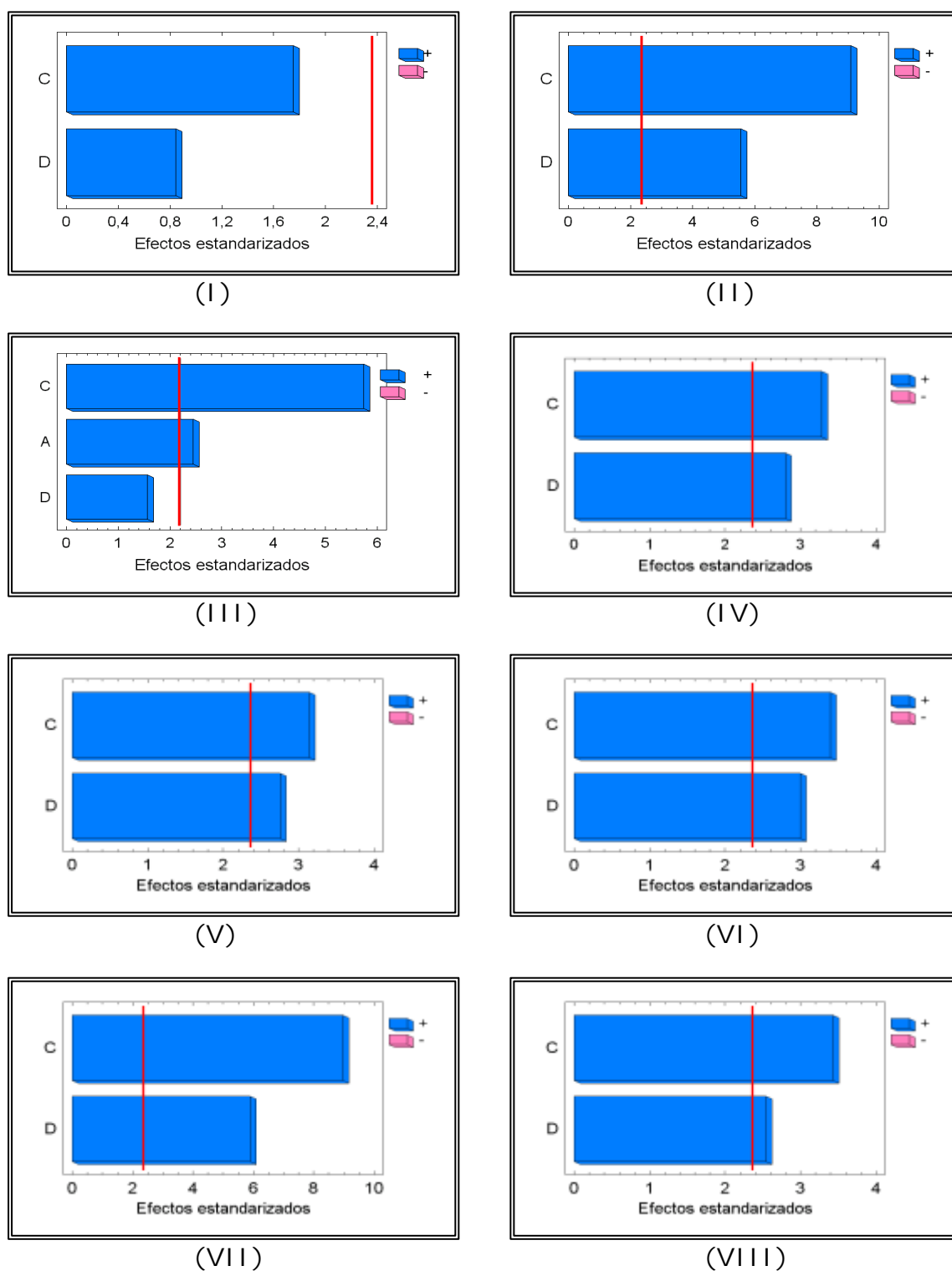


Figura 33 (I-VIII).- Cartas Pareto estandarizadas de los efectos principales en el diseño factorial. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación. La línea vertical indica el límite de significación estadística. (I) Cadmio; (II) Cobalto; (III) Cromo; (IV) Cobre; (V) Hierro; (VI) Manganeso; (VII) Níquel; (VIII) Plomo; (IX) Cinc

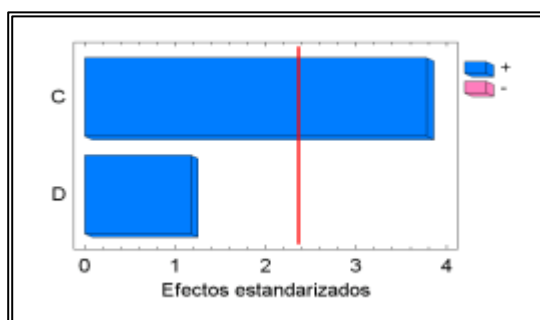
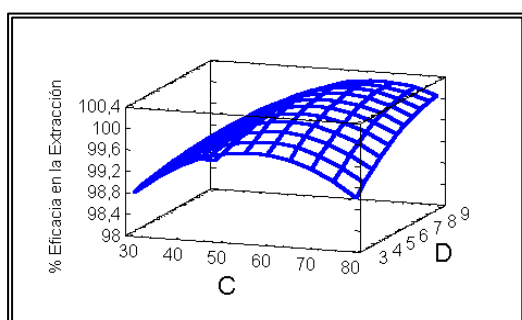
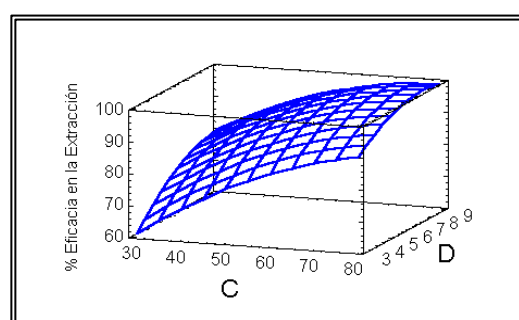


Figura 33 (IX).- Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial para el Cinc. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

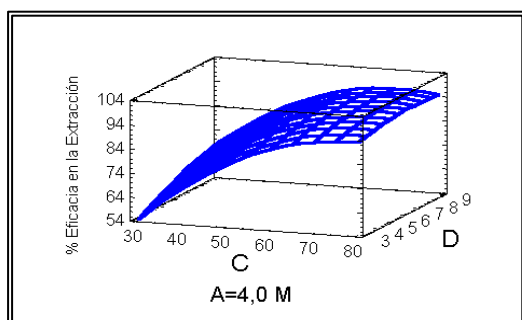
Las Figuras 34 (I-IX) muestran las superficies de respuesta estimadas obtenidas por el modelo experimental para las variables estudiadas.



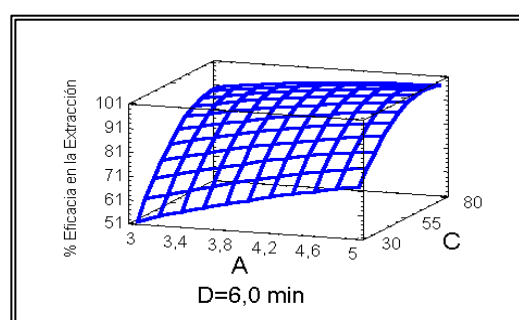
(I)



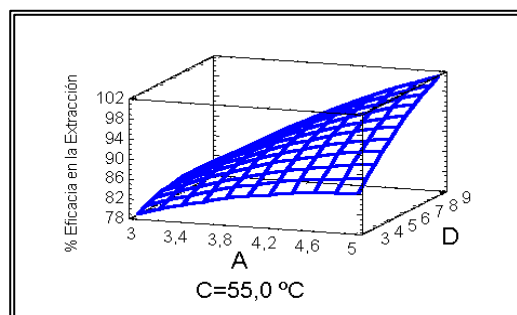
(II)



A=4,0 M



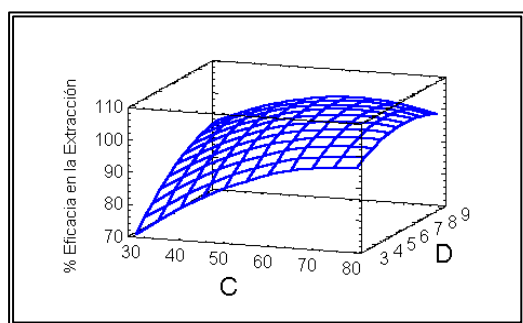
D=6,0 min



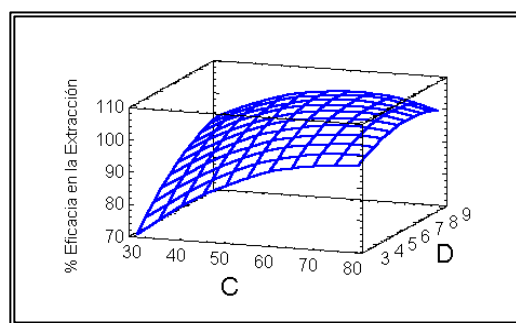
C=55,0 °C

(III)

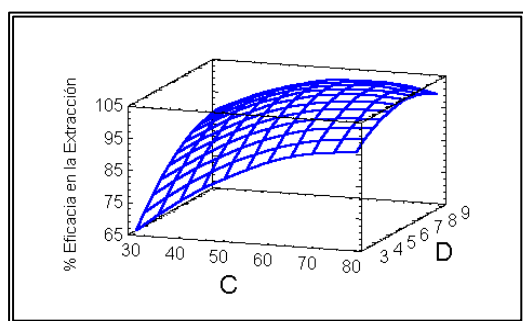
Figura 34 (I-III).- Superficies de respuesta para el modelo. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación. (I) Cadmio; (II) Cobalto; (III) Cromo



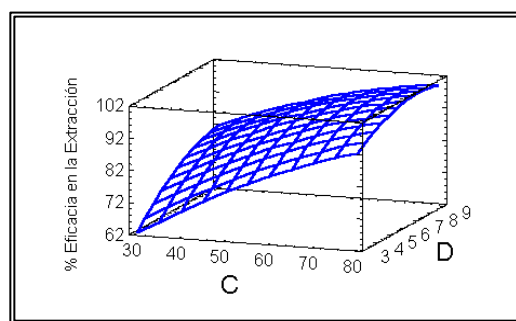
(IV)



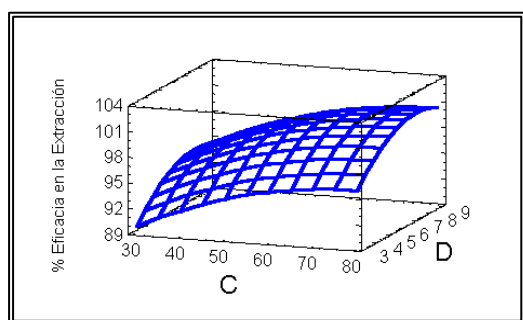
(V)



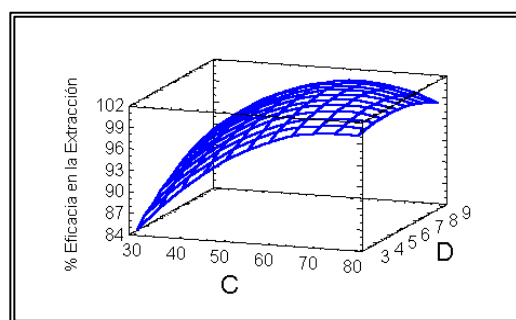
(VI)



(VII)



(VIII)



(IX)

Figura 34 (IV-IX).- Superficies de respuesta para el modelo. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación. (IV) Cobre; (V) Hierro; (VI) Manganeso; (VII) Níquel; (VIII) Plomo; (IX) Cinc

Los efectos estimados para cada variable se muestran en la Tabla XXII.

Tabla XXII.- Efectos estimados para las variables estudiadas

VARIABLE	EFECTO ESTIMADO								
	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
[HNO <sub>3</sub> ] (M)	-	-	13,7	-	-	-	-	-	-
Temperatura de lixiviación, C (°C)	0,85	24,2	32,1	16,4	16,4	18,0	23,8	6,1	10,4
Tiempo de sonicación, D (min)	0,41	14,2	8,8	12,3	13,3	15,9	13,5	4,5	3,4

Como se puede observar en la Figuras 34 (I-IX), la eficacia de la extracción es directamente proporcional a la temperatura (C) y al tiempo de sonicación (D). En el caso del cromo, la eficacia de la extracción es también directamente proporcional a la concentración de ácido nítrico.

A partir de este diseño, se obtienen los valores óptimos, a diferencia del diseño de screening que sólo indica el comportamiento de las variables con respecto al proceso. Como era de esperar y a la vista de las superficies de respuesta obtenidas (Figuras 34 (I-IX)), se encuentran los valores óptimos de las variables dentro de los intervalos de trabajo que previamente se habían fijado. Estos valores óptimos se muestran en la Tabla XXIII y se eligieron con el objetivo de alcanzar un % Eficacia en la Extracción cuantitativo (mayor que un 95 %) en el menor tiempo posible para conseguir que la frecuencia de muestreo sea lo más elevada posible. Así, es posible extraer el cobalto, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel, plomo y cinc a menor temperatura: 70, 70, 60, 60, 70, 70, 50 y 40 °C, respectivamente, pero si el tiempo de sonicación era de 1 minuto más.

Tabla XXIII.- Valores óptimos para las variables según cada diseño central composicional

	VALORES ÓPTIMOS								
VARIABLE	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
[HNO <sub>3</sub> ] (M)	-	-	4	-	-	-	-	-	-
Temperatura de lixiviación, C (°C)	30	80	80	70	70	80	80	60	50
Tiempo de sonicación, D (min)	3	4	7	3	3	3	4	3	3

Como en el diseño de superficie de respuesta el menor tiempo de sonicación estudiado fue de 3 min, se estudió la posibilidad de reducirlo incrementando la temperatura de lixiviación para el cadmio, cobre, hierro, plomo y cinc. De esta manera, los resultados obtenidos demostraron que para el cobre y el hierro si se aumentaba la temperatura a 80 °C, el tiempo de sonicación podía ser de 2 minutos. Para el cadmio aumentando la temperatura hasta 50 °C, el tiempo de sonicación puede ser de 1 minuto, y para el cinc y el plomo incrementándolo hasta 60 °C y 70 °C, respectivamente, puede ser de 2 minutos. Sin embargo, si se utilizan tiempos menores y se aumenta la temperatura de lixiviación, éstos no son suficientes para alcanzar un % Eficacia en la Extracción cuantitativo.

Como el caudal de lixiviación, presentaba en el diseño de screening un valor estimado positivo que era muy pequeño (0,05-2,9) para Cd, Co, Cu, Fe, Mn y Zn, mientras que para Cr, Ni y Pb presentaba un valor negativo (en los casos de Cr y Ni, los valores más altos, -12,7 y -10,3) (Tabla XV), se realizaron ensayos fuera del marco del diseño utilizando el valor optimizado de las demás variables con el objetivo de poder unificar el caudal de lixiviación. Así, se escogió el caudal de 3 mL/min, ya que de todos los valores, los negativos para cromo y níquel fueron los más altos. Los resultados obtenidos demostraron que un caudal de 3 mL/min era adecuado para extraer cuantitativamente a todos los metales del filtro de captación de aire, y de esta



#### 4.- OPTIMIZACIÓN DE LOS RESTANTES PARÁMETROS DEL SISTEMA FIA

En los diseños experimentales sólo se han considerado las variables que afectan al proceso continuo de lixiviación. A continuación, se procedió a realizar la optimización univariante de las restantes variables que afectan al sistema FIA. Así, se optimizaron:

- a) La longitud del reactor de mezcla
- b) El bucle de inyección
- c) Los caudales del nebulizador y del portador

##### *a) Longitud del reactor de mezcla*

El reactor del sistema FIA tiene como función homogeneizar el lixiviado de la muestra. Este reactor como mínimo, debe tener una longitud tal que contenga un volumen de 2 mL (volumen de lixivante utilizado). Por otra parte, no interesa que este reactor tenga una longitud mayor, ya que esto prolongaría el tiempo de análisis y disminuiría la frecuencia de muestreo. Así se consideró como óptimo para el reactor una longitud de 398 cm, longitud correspondiente a 2 mL de lixiviado.

##### *b) Bucle de inyección*

El volumen del bucle de la válvula de inyección que se consideró como óptimo fue 250  $\mu$ L. No se consideraron volúmenes menores, ya que se perdería sensibilidad en el análisis porque la dispersión sería mayor. Tampoco se planteó aumentar el volumen del bucle, para así poder realizar por lo menos tres réplicas del análisis para cada una de las muestras y comprobar la homogeneidad del extracto ácido obtenido.

##### *c) Caudales del nebulizador y del portador*

El objetivo de optimizar estos caudales es buscar una combinación de ambos que proporcione la menor dispersión posible del lixiviado. La dispersión en un sistema FIA se relaciona con la dilución que se produce en



dicho sistema. Para ello, se han realizado experiencias a distintos caudales de portador con sus correspondientes caudales en el nebulizador para una disoluciones patrón de cobre. Teniendo en cuenta que el caudal del nebulizador debe ser igual o ligeramente superior que el caudal de portador. Las pruebas realizadas incluyendo las dispersiones obtenidas en cada caso se indican en la Tabla XXV. El coeficiente de dispersión, D, se calculó según indican Hansen y col. [206]:

$$D = \frac{\text{pendiente del calibrado}}{\text{pendiente del calibrado FIA}}$$

Tabla XXV.- Dispersiones obtenidas utilizando diferentes caudales de portador y de nebulizador

EXPERIMENTO	CAUDAL DE PORTADOR (mL/min)	CAUDAL DE NEBULIZADOR (mL/min)	DISPERSIÓN (D)
1	6	6	1,4
2	5	5	1,3
3	4	4	1,2
4	3,5	3,5	1,1
5	3	3	1,1

A la vista de los resultados obtenidos, se observa que en todos los casos la dispersión es menor que 3 (sistema FIA de dispersión limitada), y por lo tanto se pueden considerar como aceptables los valores obtenidos para un sistema FIA según Hansen y col. [206]. Además, se observa que la menor dispersión se obtiene con caudales de portador hasta 3,5 mL/min. Como la sensibilidad alcanzada es mayor utilizando un caudal de nebulizador de 3,5 mL/min, éste fue el caudal elegido como óptimo. Por tanto, la dispersión del sistema FIA utilizado es 1,1.

## 5.- MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES EN HUMOS DE SOLDADURA

### 5.1.- Aparatos, Instrumentación Analítica y Reactivos

#### *Aparatos e Instrumentación Analítica*

Ver página 106.

Las condiciones de medida para cada metal en el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer Modelo 5000 se muestran en la Tabla XXVI. En el espectrofotómetro de absorción atómica se emplearon lámparas de cátodo hueco (Perkin-Elmer) usando siempre un corrector de fondo con lámpara de deuterio.

Tabla XXVI.- Condiciones de medida para cada metal en el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 5000

	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Longitud de onda (nm)	228,8	240,7	357,9	324,8	248,3	279,5	232,0	217,0	213,9
Rendija (nm)	0,7	0,2	0,7	0,7	0,2	0,2	0,2	0,7	0,7
Tipo de lámpara	CH <sup>1</sup>	CH <sup>1</sup>	CH <sup>1</sup>	CH <sup>1</sup>	CH <sup>1</sup>	CH <sup>1</sup>	CH <sup>1</sup>	CH <sup>1</sup>	CH <sup>1</sup>
Intensidad de la lámpara (mA)	8	30	30	10	30	30	30	15	10
Tipo de llama	Ox <sup>2</sup>	Ox <sup>2</sup>	Red <sup>3</sup>	Ox <sup>2</sup>	Ox <sup>2</sup>	Ox <sup>2</sup>	Ox <sup>2</sup>	Ox <sup>2</sup>	Ox <sup>2</sup>
Caudal aire (mL/min)	15	15	14	15	15	15	15	15	15
Caudal acetileno (mL/min)	2	2	4,5	2	2	2	2	2	2
Límite de linealidad (µg/mL)	2	3,5	5	5	5	2	2	20	1

<sup>1</sup> CH, cátodo hueco.

<sup>2</sup> Ox, oxidante.

<sup>3</sup> Red, reductora.

#### *Reactivos*

Ver página 107.

### 5.2.- Procedimiento para la Determinación de Metales en Humos de Soldadura

El esquema de trabajo del método optimizado para la determinación de metales en humos de soldadura se basa en dos etapas:

1) En una primera etapa se realiza la lixiviación del filtro de captación de aire (Figura 35). Para ello se inserta éste con cuidado en la minicolumna una vez enrollado con la ayuda de unas pinzas de plástico. Posteriormente, se colocan dos filtros de papel en los extremos de la columna para evitar pérdidas de partículas sólidas a través del sistema. Una vez preparada la minicolumna, se conecta en el sistema de flujo continuo, se llena el sistema de disolución lixivante por medio de la VS1 (2 mL de ácido nítrico 3M o ácido nítrico 4 M en el caso del cromo), manteniendo la temperatura del baño a 50 °C para el Cd, a 60 °C para el Zn, a 70 °C para el Pb y a 80 °C para el Co, Cr, Cu, Fe, Mn y Ni durante todo el proceso. Después, se somete a la minicolumna a la acción de la energía de ultrasonidos durante 1 min para el Cd, 2 min para Cu, Fe, Pb y Zn, 3 min para el Mn, 4 min para Ni y Co, y 7 min para el Cr, a la vez que circula a su través la disolución lixivante.

El sentido del movimiento del lixivante que circula a través de la columna a 3 mL/min se cambia cada 30 s para que no se produzcan compactaciones del filtro en la minicolumna.

Si el objetivo fuera extraer todos los metales al mismo tiempo, la disolución lixivante sería ácido nítrico 4 M, la temperatura de lixiviación 80 °C y el tiempo de sonicación 7 min.

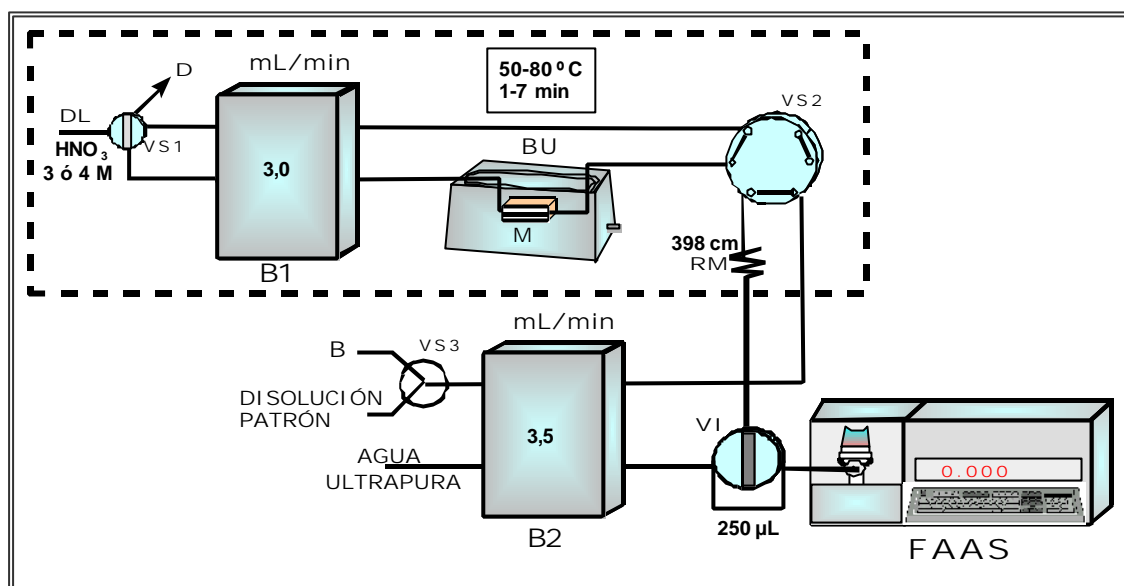


Figura 35.- Proceso de lixiviación continua y medida de la disolución blanco. B, blanco; BU, baño de ultrasonidos; B1 y B2, bombas peristálticas; D, desecho; DL, disolución lixiviante; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama; M, columna conteniendo la muestra (filtro); RM, reactor de mezcla; VI, válvula de inyección; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección

2) Una vez realizada la lixiviación de la muestra, se gira la válvula de selección (VS2) pasando el lixiviado a la segunda parte del sistema, mientras que la disolución blanco va al desecho (Figura 36). En esta parte, el lixiviado se homogeneiza en un reactor de mezcla. Tras ser homogeneizado, se inyectan 250 µL de lixiviado en una corriente portadora (agua ultrapura) a través de una válvula de inyección. Esta disolución portadora que circula a un caudal de 3,5 mL/min, transporta el bolo de muestra hasta el nebulizador de un espectrofotómetro de absorción atómica con llama, donde se detectan los metales de forma continua según las condiciones de medida para cada metal en el espectrofotómetro de absorción atómica (Tabla XXVI).

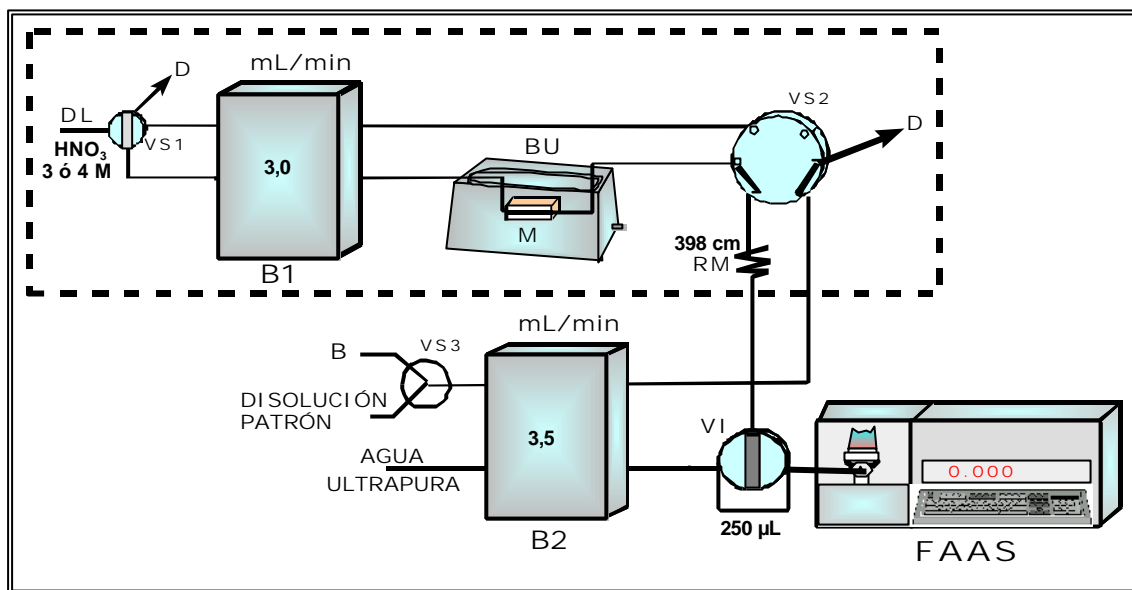


Figura 36.- Determinación de los metales en el lixiviado. B, blanco; BU, baño de ultrasonidos; B1 y B2, bombas peristálticas; D, desecho; DL, disolución lixiviante; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama; M, columna conteniendo la muestra (filtro); RM, reactor de mezcla; VI, válvula de inyección; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección

Para realizar las rectas de calibrado se gira la válvula de selección (VS2) para cambiar la posición que se muestra en la Figura 36, a la posición que aparece en la Figura 37, y así poder introducir secuencialmente en el sistema FIA disoluciones patrón de distintas concentraciones de cada metal (preparadas en ácido nítrico 4 M en el caso del cromo y en ácido nítrico 3 M para los demás metales) a través de la válvula de inyección (VI). El volumen inyectado de cada disolución patrón en la disolución portadora es de 250  $\mu\text{L}$  (igual que el de la muestra). De este modo, los metales se detectan de manera continua en el espectrofotómetro de absorción atómica con llama. La disolución blanco es ácido nítrico 4M para el cromo y ácido nítrico 3 M en el caso de los demás metales.

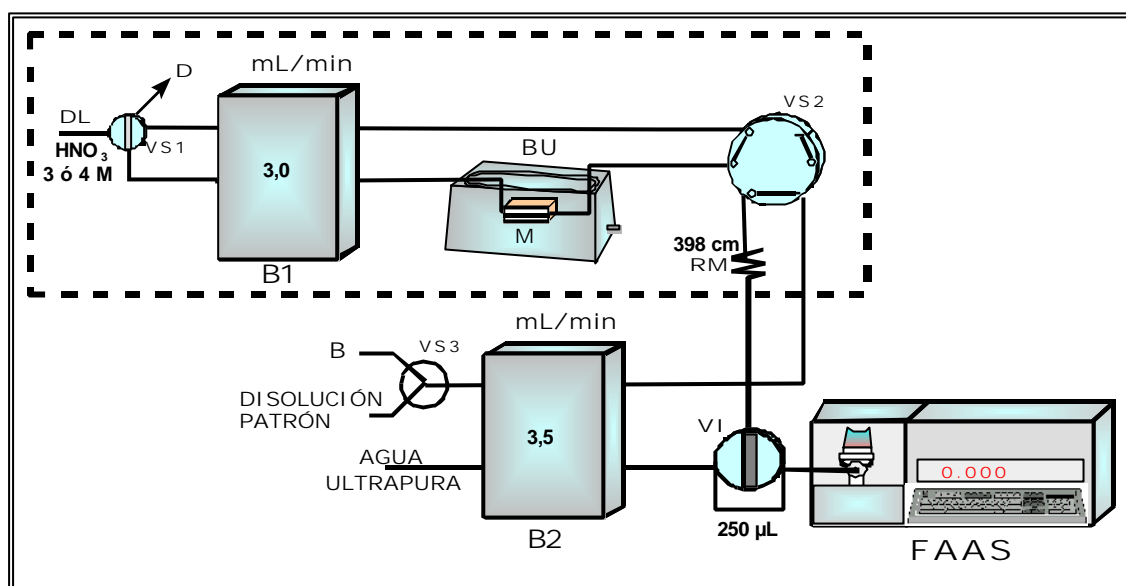


Figura 37.- Medida de las disoluciones patrón de los distintos metales. B, blanco; BU, baño de ultrasonidos; B1 y B2, bombas peristálticas; D, desecho; DL, disolución lixiviante; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama; M, columna conteniendo la muestra (filtro); RM, reactor de mezcla; VI, válvula de inyección; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección

## 6.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES EN HUMOS DE SOLDADURA

Se evaluaron las características analíticas del método desarrollado para la determinación de metales en humos de soldadura, calculando los límites de detección y cuantificación, la sensibilidad, el intervalo lineal, la precisión y la exactitud. Además, se estudió el efecto matriz comparando las rectas de calibrado y adición, y se determinó la frecuencia de muestreo.

### 6.1. Rectas de Calibrado

Se realizaron dos rectas de calibrado:

- Un calibrado directo que se realizó a través de la medida directa en el espectrofotómetro de absorción atómica con llama de disoluciones patrón de los distintos metales. Las concentraciones de las disoluciones patrón de los distintos metales se muestran en la Tabla XXVII, y las rectas de calibrado aparecen en las Figuras 38 (I-IX).

Tabla XXVII.- Características de las disoluciones patrón de los distintos metales utilizadas para trazar la recta de calibrado

	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Intervalo de concentración de las disoluciones patrón ( $\mu\text{g/mL}$ )	0-2	0-3,5	0-5	0-5	0-5	0-2	0-2	0-20	0-1
Medio en que se prepararon las disoluciones	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 4 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M

- Un calibrado realizado usando el sistema FIA propuesto con las mismas disoluciones patrón que el caso anterior (Figuras 39 (I-IX)).

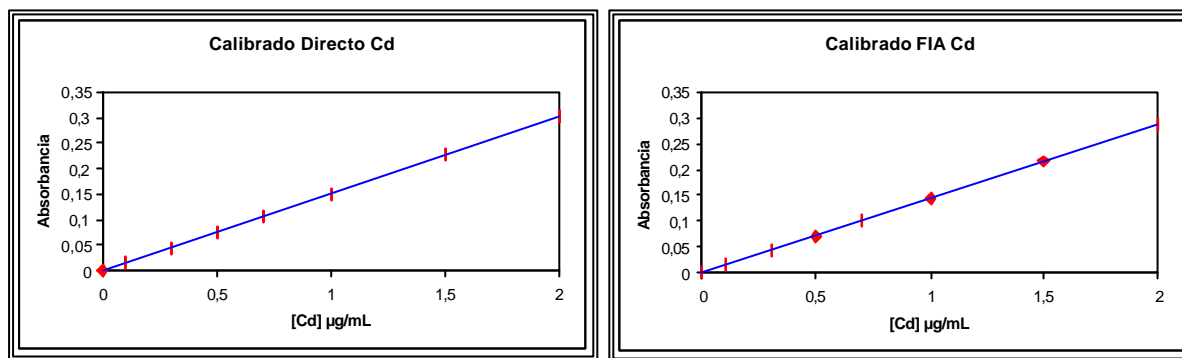


Figura 38 (I).- Calibrado Directo para el Cd:  $A = 0,151 (\text{Cd}, \mu\text{g/mL}) + 8 \times 10^{-4}$ ;  
 $r = 0,9999$   
 Calibrado FIA para el Cd:  $A = 0,144 (\text{Cd}, \mu\text{g/mL}) + 3 \times 10^{-4}$ ;  
 $r = 0,9999$

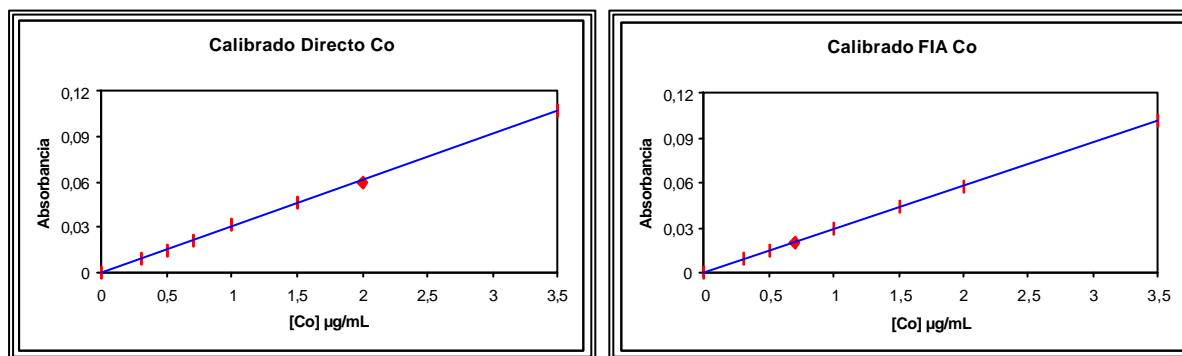


Figura 38 (II).- Calibrado Directo para el Co:  $A = 0,031 (\text{Co}, \mu\text{g/mL}) + 3 \times 10^{-4}$ ;  
 $r = 0,9999$   
 Calibrado FIA para el Co:  $A = 0,029 (\text{Co}, \mu\text{g/mL}) + 8 \times 10^{-5}$ ;  
 $r = 0,9999$

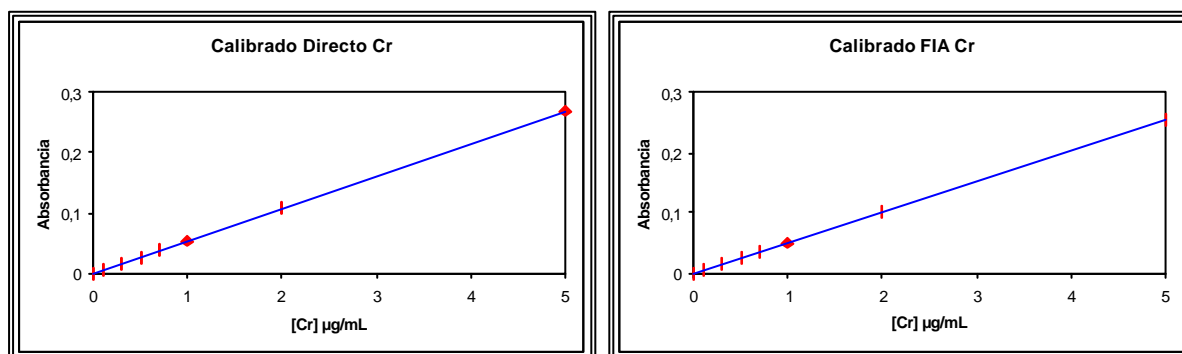


Figura 38 (III).- Calibrado Directo para el Cr:  $A = 0,054 (\text{Cr}, \mu\text{g/mL}) + 1,0 \times 10^{-4}$ ;  
 $r = 0,9999$   
 Calibrado FIA para el Cr:  $A = 0,051 (\text{Cr}, \mu\text{g/mL}) + 3,0 \times 10^{-4}$ ;  
 $r = 0,9999$



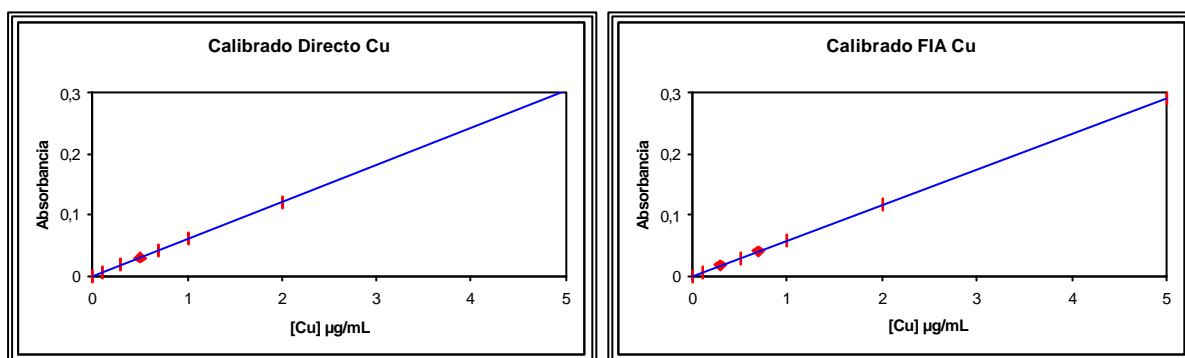


Figura 38 (IV).- Calibrado Directo para el Cu:  $A = 0,061(\text{Cu}, \mu\text{g/mL}) + 5,0 \times 10^{-4}$ ;  
 $r = 0,9999$   
 Calibrado FIA para el Cu:  $A = 0,058(\text{Cu}, \mu\text{g/mL}) + 2,0 \times 10^{-4}$ ;  
 $r = 0,9999$

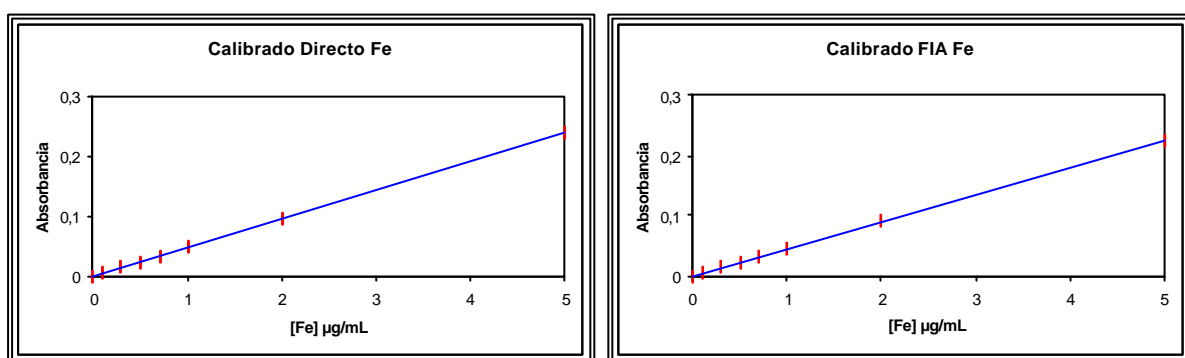


Figura 38 (V).- Calibrado Directo para el Fe:  $A = 0,048(\text{Fe}, \mu\text{g/mL}) + 3,0 \times 10^{-4}$ ;  
 $r = 0,9999$   
 Calibrado FIA para el Fe:  $A = 0,045(\text{Fe}, \mu\text{g/mL}) + 7,0 \times 10^{-4}$ ;  
 $r = 0,9999$

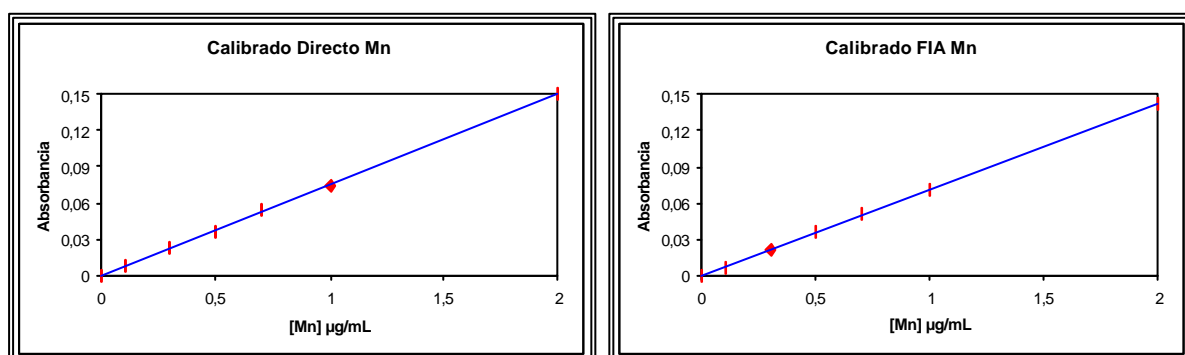


Figura 38 (VI).- Calibrado Directo para el Mn:  $A = 0,075(\text{Mn}, \mu\text{g/mL}) + 4,0 \times 10^{-4}$ ;  
 $r = 0,9999$   
 Calibrado FIA para el Mn:  $A = 0,071(\text{Mn}, \mu\text{g/mL}) + 3,0 \times 10^{-5}$ ;  
 $r = 0,9999$

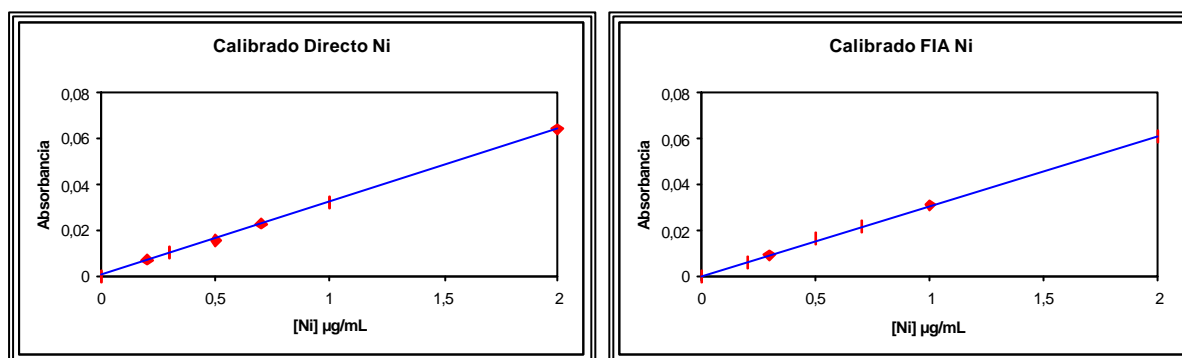


Figura 38 (VII).- Calibrado Directo para el Ni:  $A=0,034(\text{Ni}, \mu\text{g/mL}) + 6,0 \times 10^{-4}$ ;  
 $r = 0,9999$   
 Calibrado FIA para el Ni:  $A = 0,031(\text{Ni}, \mu\text{g/mL}) + 2,0 \times 10^{-4}$ ;  
 $r = 0,9999$

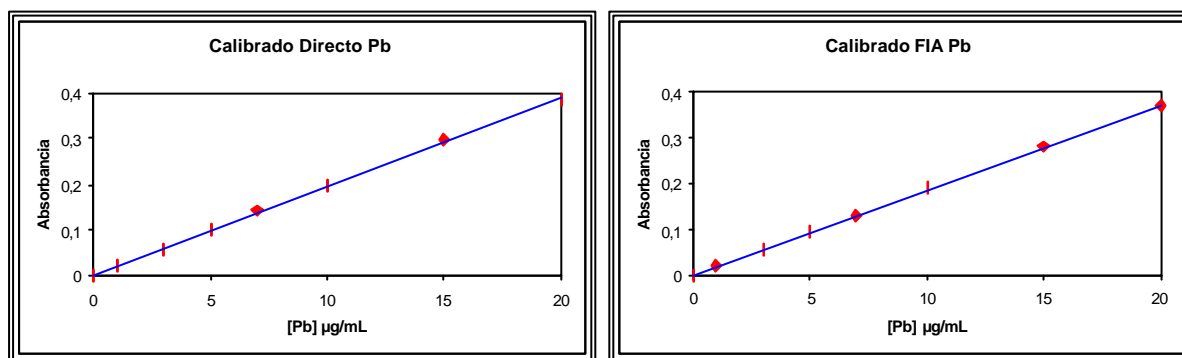


Figura 38 (VIII).-Calibrado Directo para el Pb: $A=0,0195(\text{Pb}, \mu\text{g/mL}) + 2,0 \times 10^{-3}$ ;  
 $r = 0,9999$   
 Calibrado FIA para el Pb:  $A=0,0186(\text{Pb}, \mu\text{g/mL}) + 8,0 \times 10^{-4}$ ;  
 $r = 0,9999$

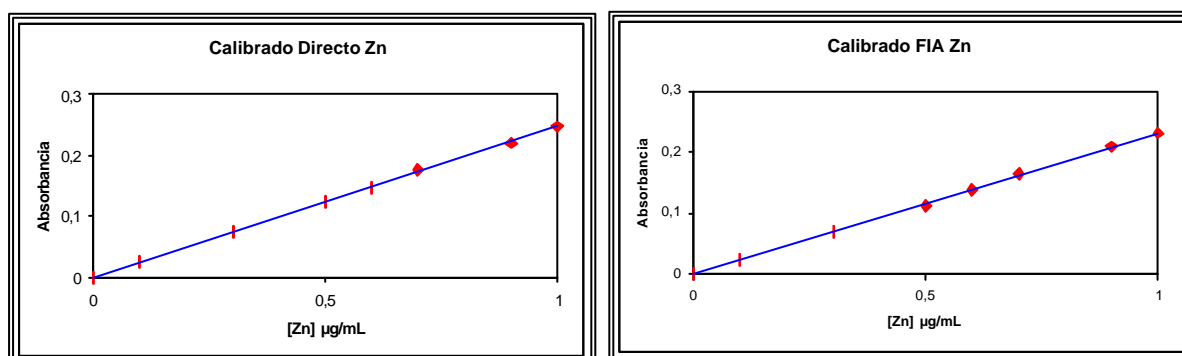


Figura 38 (IX).- Calibrado Directo para el Zn:  $A=0,240(\text{Zn}, \mu\text{g/mL}) + 4,0 \times 10^{-3}$ ;  
 $r = 0,9999$   
 Calibrado FIA para el Zn:  $A = 0,230(\text{Zn}, \mu\text{g/mL}) + 2,0 \times 10^{-4}$ ;  
 $r = 0,9999$

## 6.2.- Límites de Detección y Límites de Cuantificación

El límite de detección (LOD) se define como la menor concentración que puede determinarse siendo estadísticamente distinta de un blanco estadístico [207]. Para un nivel de confianza de un 99%, el límite de detección se define como:

$$\text{LOD} = 3\sigma$$

$\sigma$ =desviación estándar de una serie de 30 medidas de un blanco

Según la definición de la IUPAC, el LOD, expresado como la concentración  $X_d$ , se obtiene de la menor medida,  $y_d$ , que puede detectarse con certidumbre razonable para un procedimiento analítico. De esta definición se deduce claramente que la discusión ha de llevarse a cabo en dos etapas:

1. Establecer una señal de detección
2. Mediante la curva de calibrado convertir esta señal en una concentración.

El cálculo del LOD se realizó en base a la determinación de 30 medidas de un blanco (disolución lixivante (ácido nítrico 4 M para el cromo y ácido nítrico 3 M para los demás metales) pasada a través de un filtro nuevo, no expuesto, insertado en la columna de extracción)), realizadas en las condiciones óptimas. Se calculó el valor de  $3\sigma$  y se sustituyó en la recta de calibrado del método para cada metal. En estas condiciones los valores de LOD para cada uno de los metales se muestran en la Tabla XXVIII. Estos LODs también se refirieron a los distintos volúmenes de aire muestreados en cada caso a un caudal de 1,5 mL/min.

Tabla XXVIII.- Límites de detección (LOD) para la determinación de metales en humos de soldadura

	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	t muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	LOD ( $\mu\text{g/m}^3$ )
Cd	8,4	45	67,5	0,2
		90	135	0,1
Co	41,4	45	67,5	1,2
		90	135	0,6
Cr	23,5	30	45	1,0
		60	90	0,5
Cu	20,7	30	45	0,9
		60	90	0,5
Fe	26,7	2	3	17,8
		5	7,5	7,1
		10	15	3,6
Mn	16,9	10	15	2,3
		15	22,5	1,5
Ni	38,7	15	22,5	3,4
		30	45	1,7
Pb	64,5	90	135	1,0
		120	180	0,7
Zn	5,2	2	3	3,5
		5	7,5	1,4

El límite de cuantificación (LOQ) se define como el nivel por encima del cual pueden obtenerse resultados cuantitativos con un nivel de confianza del 99%.

$$\text{LOQ} = 10\sigma$$

$\sigma$ =desviación estándar de una serie de 30 medidas de un blanco

El cálculo del LOQ se realizó en base a la determinación de 30 medidas de un blanco (ácido nítrico 4 M para el cromo y ácido nítrico 3 M para los demás metales), realizadas en las condiciones óptimas. Se calculó el valor de  $10\sigma$  y se substituyó en cada recta de calibrado del método. En estas condiciones los valores de LOQ para cada metal se muestran en la Tabla XXIX. Estos LOQs se refirieron también a los distintos volúmenes de aire muestreados y también aparecen en la Tabla XXIX.

Tabla XXIX.- Límites de cuantificación (LOQ) para la determinación de metales en humos de soldadura

	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )	t muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	LOQ ( $\mu\text{g/m}^3$ )
Cd	28,0	45	67,5	0,8
		90	135	0,4
Co	138,0	45	67,5	4,1
		90	135	2,1
Cr	78,4	30	45	3,5
		60	90	1,8
Cu	69,0	30	45	3,1
		60	90	1,5
Fe	88,9	2	3	59,3
		5	7,5	23,7
		10	15	11,9
Mn	56,3	10	15	7,5
		15	22,5	5,0
Ni	129,0	15	22,5	11,5
		30	45	5,7
Pb	215,1	90	135	3,2
		120	180	2,4
Zn	17,3	2	3	11,5
		5	7,5	4,6

### 6.3.- Sensibilidad del Método Analítico

La sensibilidad de un método analítico mide la capacidad de dicho método para diferenciar entre pequeñas variaciones en la concentración de analito. Según la IUPAC la sensibilidad se define como la pendiente de la recta de calibrado del método. Por tanto, la sensibilidad para los distintos metales se muestra en la Tabla XXX. Expresando la sensibilidad del método en función de los volúmenes de aire muestreados se obtienen los resultados en  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , los cuales también aparecen en la Tabla XXX.

Además, se calculó la sensibilidad para un 1% de absorción (absorbancia= 0,0044) que se alcanza con la espectroscopía de absorción atómica con llama. Expresando la sensibilidad para un 1% de absorción en función de los volúmenes de aire muestreados se obtienen los resultados expresados en  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , los cuales se presentan en la Tabla XXX.

### 6.4.-Intervalo Lineal

Según las ecuaciones de las rectas, los límites de cuantificación obtenidos, la dispersión del sistema FIA (1,1) y conociendo que en espectroscopía de absorción atómica con llama los límites de linealidad para la determinación directa de los metales son los que se muestran en la Tabla XXVI (página 154), los intervalos lineales correspondientes a la determinación de cada metal se reflejan en la Tabla XXXI. Los intervalos lineales se han expresado en función de los volúmenes de aire muestreados en cada caso.

Tabla XXX.- Sensibilidad en la determinación de metales en humos de soldadura

	Sensibilidad ( $\mu\text{g/L}$ )	t muestreo (min)	V de aire muestreado (L)	Sensibilidad 1 % absorción ( $\mu\text{g/m}^3$ )
Cd	144,0	45	67,5	0,8
		90	135	0,4
Co	29,0	45	67,5	4,4
		90	135	2,2
Cr	51,0	30	45	3,6
		60	90	1,8
Cu	58,0	30	45	3,2
		60	90	1,6
Fe	45,0	2	3	54,8
		5	7,5	21,9
		10	15	11,0
Mn	71,0	10	15	8,2
		15	22,5	5,5
Ni	31,0	15	22,5	12,0
		30	45	6,0
Pb	18,6	90	135	2,9
		120	180	2,2
Zn	230,0	2	3	12,2
		5	7,5	4,9

Tabla XXXI.- Intervalos lineales en la determinación de metales en humos de soldadura

	Tiempo de muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	Intervalo Lineal ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
Cd	45	67,5	0,8 – 65,2
	90	135	0,4 – 32,6
Co	45	67,5	4,1 – 114,1
	90	135	2,1 – 57,0
Cr	30	45	3,5 – 244,4
	60	90	1,8 – 122,2
Cu	30	45	3,1 – 244,4
	60	90	1,5 – 122,2
Fe	2	3	59,3 – 3666,7
	5	7,5	23,7 – 1466,7
	10	15	11,9 – 733,3
Mn	10	15	7,5 – 293,3
	15	22,5	5,0 – 195,6
Ni	15	22,5	11,5 – 195,6
	30	45	5,7 – 97,8
Pb	90	135	3,2 – 325,9
	120	180	2,4 – 244,4
Zn	2	3	11,5 – 733,3
	5	7,5	4,6 – 293,3



### 6.5.-Estudio de la Precisión del Método

Para evaluar la precisión del método analítico se hizo un estudio de la repetibilidad. La repetibilidad de un método se define desde un punto de vista cualitativo como la concordancia entre los resultados sucesivos obtenidos sobre una misma muestra cuando se llevan a cabo determinaciones siguiendo el mismo método analítico, en idénticas condiciones experimentales (instrumentos, operador, laboratorio, etc.) y trabajando con poca diferencia de tiempo entre las determinaciones. Desde un punto de vista cuantitativo, la repetibilidad se puede definir como la diferencia máxima entre dos resultados cualesquiera expresados en valor absoluto obtenidos en unas condiciones especificadas para un determinado nivel de significación ( $P=0,05$ ) [207].

En este estudio se tuvo en cuenta la repetibilidad del proceso global para la determinación de metales en humos de soldadura. Con el objetivo de comprobar la precisión de dos concentraciones distintas de cada metal, se midieron veintidós muestras reales medidas en dos puntos de muestreo distintos (once filtros de captación de aire para cada punto de muestreo) que se analizaron con el sistema FIA propuesto, y en las condiciones óptimas. Con los resultados obtenidos se calculó la desviación estándar, la media y el coeficiente de variación. Estos valores se muestran en la Tabla XXXII.

La desviación estándar,  $\sigma$ , viene dada por la siguiente expresión:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Siendo:

$x_i$  = valor de la concentración hallado en la muestra.

$\bar{x}$  = media aritmética de las concentraciones

$x_i - \bar{x}$  = diferencia entre cada valor de la concentración y la media aritmética respectiva

$n$  = número de medidas efectuadas en cada caso (once)

El coeficiente de variación (CV) se calcula según la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} 100$$

Tabla XXXII.- Estudio de la precisión en la determinación de metales en humos de soldadura

	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Tiempo de muestreo (min)	90	90	30	30	2	10	15	90	2
Volumen de aire muestreado (L)	135	135	45	45	3	15	22,5	135	3
Punto de muestreo	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV
$\bar{x}$ ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	1,7	8,0	91,0	96,3	2979,1	194,3	144,9	42,7	146,2
$s$ ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	0,05	0,3	0,5	0,8	12,3	1,6	2,3	0,8	2,4
CV (%)	3,2	3,4	0,6	0,8	0,4	0,8	1,6	1,9	1,6
Punto de muestreo	III	III	I	I	I	I	II	II	I
$\bar{x}$ ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	0,6	3,1	9,3	9,7	510,7	47,7	21,9	9,4	16,2
$s$ ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	0,05	0,3	0,6	0,4	9,9	1,2	1,4	0,4	1,6
CV (%)	8,3	9,7	6,5	4,1	1,9	2,5	6,4	4,3	9,8

#### 6.6.- Estudio de la Exactitud del Método

Como no existe material de referencia que certifique el contenido de metales en una muestra como la analizada (humos de soldadura) se procedió a estudiar la exactitud de la metodología analítica propuesta mediante un método de referencia (método establecido por el INSHT [85]) y mediante el cálculo del porcentaje de recuperación, es decir, analizando muestras reales a las que se les ha añadido una cantidad conocida de cada metal.

##### 6.6.1. Comparación con el método de referencia

Este estudio se aplicó a muestras tomadas en distintos puntos de muestreo. La concentración de cada metal se determinó mediante el método establecido por el INSHT [85]. Las concentraciones obtenidas para cada metal son las que aparecen en la Tabla XXXIII.

También se tomaron otras muestras en los mismos puntos de muestreo para determinar su contenido en metales por el método propuesto. Las

concentraciones obtenidas por el método propuesto se muestran en la Tabla XXXIV.

Tabla XXXIII.- Concentraciones de los metales distintos puntos de muestreo obtenidas por el método oficial

	Punto de Muestreo	Tiempo de muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	Concentración media $\pm$ desviación estándar, $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (n=6)
Cd	IV	150	225	$1,7 \pm 0,1$
Co	IV	180	270	$8,3 \pm 0,6$
Cr	IV	30	45	$90,8 \pm 3,3$
Cu	IV	30	45	$95,8 \pm 4,2$
Fe	III	5	7,5	$1674,1 \pm 55,4$
Mn	II	15	22,5	$84,5 \pm 3,4$
Ni	IV	30	45	$143,4 \pm 6,4$
Pb	IV	120	180	$42,9 \pm 2,4$
Zn	II	15	22,5	$33,6 \pm 1,6$

Tabla XXXIV.- Concentraciones de los metales distintos puntos de muestreo obtenidas por el método propuesto

	Punto de Muestreo	Tiempo de muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	Concentración media $\pm$ desviación estándar, $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (n=6)
Cd	IV	90	135	$1,7 \pm 0,1$
Co	IV	90	135	$8,0 \pm 0,3$
Cr	IV	30	45	$91,0 \pm 0,6$
Cu	IV	30	45	$96,3 \pm 0,8$
Fe	III	2	3	$1495,0 \pm 23,4$
Mn	II	10	15	$80,9 \pm 1,7$
Ni	IV	15	22,5	$144,9 \pm 2,3$
Pb	IV	90	135	$42,7 \pm 0,8$
Zn	II	2	3	$31,6 \pm 1,3$

Las muestras para la determinación de cada metal se tomaron al mismo tiempo y en las mismas condiciones: mismo caudal (1,5 L/min) y mismas características de proceso de soldadura.

Con el fin de establecer la exactitud del método propuesto se aplicó el test de parejas calculándose la media y la desviación estándar de las diferencias entre los resultados obtenidos por ambos métodos para cada uno de los metales (Tabla XXXV).

Tabla XXXV.- Determinación de metales en humos de soldadura:  
test de parejas

	Concentración, $\mu\text{g}/\text{m}^3$		Diferencia
	Método Propuesto	Método Oficial	
Cd	1,7	1,7	0
Co	8,0	8,3	-0,3
Cr	91,0	90,8	0,2
Cu	96,3	95,8	0,5
Fe	1495,0	1674,1	-179,1
Mn	80,9	84,5	-3,6
Ni	144,9	143,4	1,5
Pb	42,7	42,9	-0,2
Zn	31,6	33,6	-2,0

$$\bar{X}_d = -20,33$$

$$\sigma_d = 59,56$$

Test de parejas:

a)

Hipótesis nula:	$H_0 : \bar{X}_d = 0$
Hipótesis alternativa:	$H_1 : \bar{X}_d \neq 0$

b) Cálculo del valor de t experimental: 
$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{X}_d \sqrt{n}}{\sigma_d} = 1,02$$

c)  $t$  tabulado para  $n-1$  grados de libertad y 95% de probabilidad (test de dos colas):  $t_{\text{tabulado}} = 2,31$

d) Como  $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabulado}}$  se acepta  $H_0$ , al nivel de significación elegido (95%). Por tanto, los valores obtenidos sobre diferentes muestras son comparables estadísticamente al nivel de significación elegido, es decir no hay diferencias entre los resultados obtenidos por los dos métodos. Como un grupo de resultados se halló con el método de referencia, se puede decir que el otro (método propuesto) es estadísticamente comparable, y por tanto, exacto.

#### 6.6.2.- Recuperación del método

Para realizar este estudio se llevó a cabo el análisis de muestras tomadas en distintos puntos de muestreo. El método de determinación de los metales en humos de soldadura se aplicó utilizando una disolución lixivante ( $\text{HNO}_3$ , 3 M para todos los metales, excepto para el Cr que fue 4 M) a la que se le habían adicionado distintas concentraciones de cada metal (ver Tabla XXXVI).

Tabla XXXVI .- Características de las disoluciones lixiviantes utilizadas para el estudio de la recuperación analítica

	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	5,0	0,25
Medio en que se prepararon las disoluciones	$\text{HNO}_3$ 3 M	$\text{HNO}_3$ 3 M	$\text{HNO}_3$ 4 M	$\text{HNO}_3$ 3 M	$\text{HNO}_3$ 3 M	$\text{HNO}_3$ 3 M	$\text{HNO}_3$ 3 M	$\text{HNO}_3$ 3 M	$\text{HNO}_3$ 3 M

Para cada punto, todas las muestras para la determinación de cada metal se tomaron al mismo tiempo y en las mismas condiciones: mismo caudal (1,5 L/min) y mismas características de proceso de soldadura (Tabla XXXVII).

Tabla XXXVII.- Condiciones de medida de las muestras para el estudio de la recuperación analítica

	Punto de Muestreo	Tiempo de muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)
Cd	IV	90	135
Co	IV	90	135
Cr	IV	30	45
Cu	IV	30	45
Fe	III	2	3
Mn	II	10	15
Ni	III	15	22,5
Pb	IV	90	135
Zn	II	2	3

Una vez obtenidos los datos de estos análisis se calculó el % de recuperación de la siguiente forma:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

Siendo:

A: [Metal] en la muestra + [Metal] añadida

(valor calculado experimentalmente)

B: [Metal] en la muestra (valor calculado experimentalmente)

C: [Metal] añadida

Los resultados obtenidos para la recuperación analítica se reflejan en la Tabla XXXVIII.

Tabla XXXVIII.- Resultados del cálculo de la recuperación analítica

Metal determinado	% Recuperación Analítica
Cd	99,3
Co	96,6
Cr	98,0
Cu	98,3
Fe	102,2
Mn	97,1
Ni	100,0
Pb	101,1
Zn	99,1

A la vista de los resultados obtenidos, se observa que la recuperación de los metales, en todos los casos, es cuantitativa, ya que el tanto por ciento de recuperación oscila entre 96,6-102,2%.

Con estos datos se puede decir que el procedimiento utilizado para realizar la determinación de metales en humos de soldadura es exacto.

#### 6.7.- Recta de Adición

La mejor alternativa para comprobar si existe efecto matriz es utilizar la técnica de las adiciones estándar [207], que consiste en la adición de cantidades conocidas y crecientes del analito a la propia muestra problema, la lectura de las correspondientes respuestas instrumentales y la posterior construcción de la recta de adiciones estándar.

Para realizar este estudio se llevó a cabo el análisis de muestras tomadas en distintos puntos de muestreo. El método de determinación de los metales en humos de soldadura se aplicó utilizando una disolución lixivante ( $\text{HNO}_3$ , 3 M para todos los metales, excepto para el Cr que fue 4 M) a la que se le habían adicionado varias concentraciones de cada metal. El intervalo de concentraciones adicionado para cada metal se muestra en la Tabla XXXIX.

Tabla XXXIX.- Características de las rectas de adición de los distintos metales

	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Intervalo de concentración de las adiciones (µg/mL)	0-1,5	0-2,5	0-2,5	0-2,5	0-2,5	0-1,0	0-1,0	0-15,0	0-0,5
Medio en que se prepararon las disoluciones	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 4 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M

Con los resultados de absorbancia obtenidos se trazaron las rectas de adición para cada metal (Figuras 39 (I-IX)).

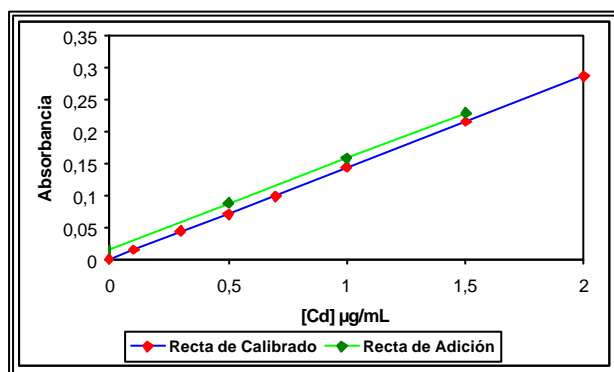


Figura 39 (I).- Cd: Recta de Adición

$$A = 0,143 (\text{Cd}, \mu\text{g/mL}) + 0,016;$$

$$r = 0,999$$

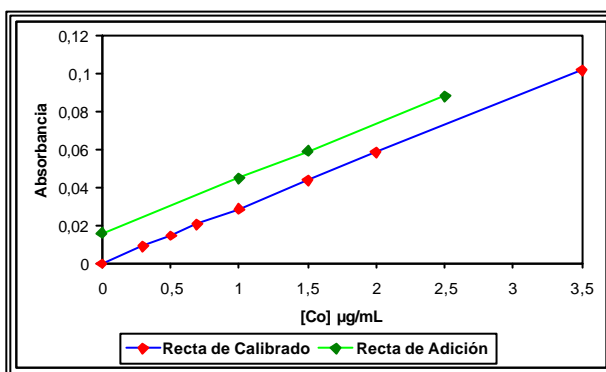


Figura 39(II).- Co: Recta de Adición

$$A = 0,029 (\text{Co}, \mu\text{g/mL}) + 0,016;$$

$$r = 0,999$$

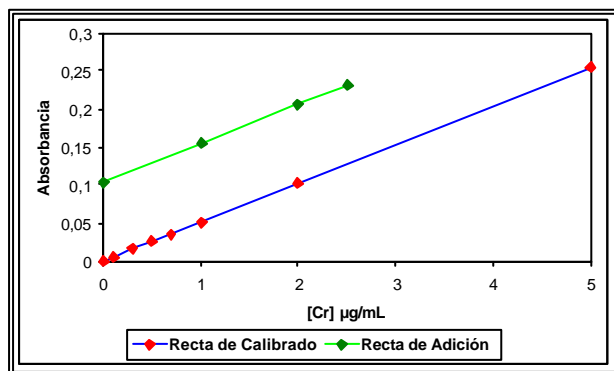


Figura 39 (III).- Cr: Recta de Adición

$$A = 0,050 (\text{Cr}, \mu\text{g/mL}) + 0,104;$$

$$r = 0,999$$

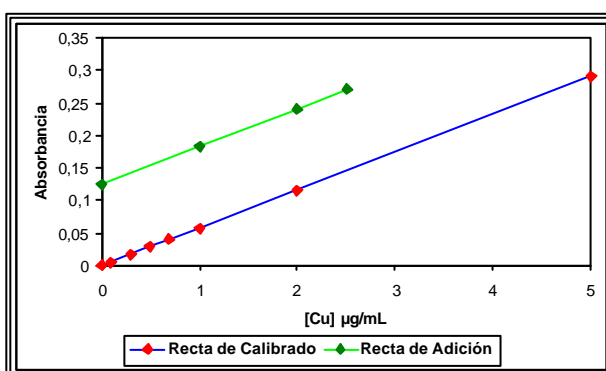


Figura 39(IV).- Cu: Recta de Adición

$$A = 0,058 (\text{Cu}, \mu\text{g/mL}) + 0,125;$$

$$r = 0,999$$



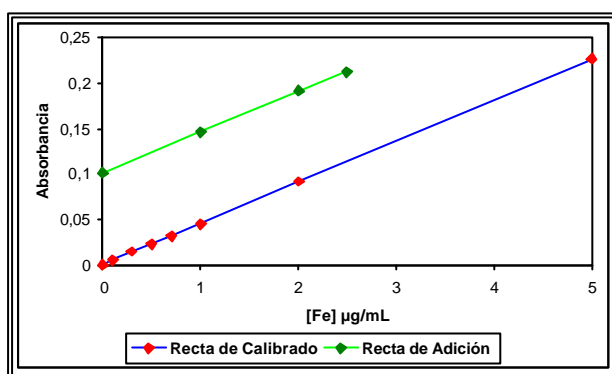


Figura 39 (V).- Fe: Recta de Adición

$$A = 0,044 (\text{Fe}, \mu\text{g/mL}) + 0,100;$$

$$r = 0,999$$

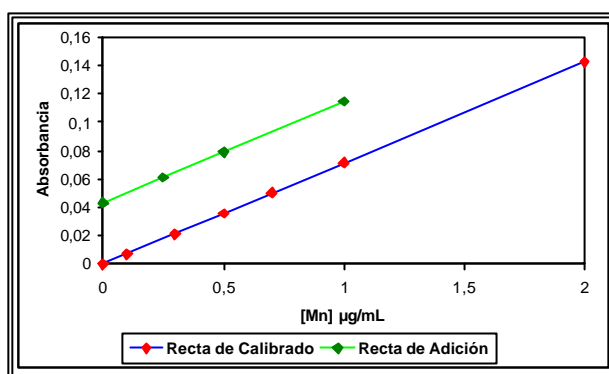


Figura 39(VI).- Mn: Recta de Adición

$$A = 0,070 (\text{Mn}, \mu\text{g/mL}) + 0,044;$$

$$r = 0,999$$

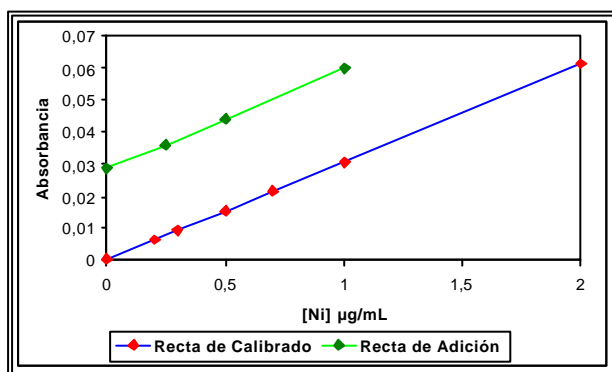


Figura 39 (VII).- Ni: Recta de Adición

$$A = 0,031 (\text{Ni}, \mu\text{g/mL}) + 0,029;$$

$$r = 0,999$$

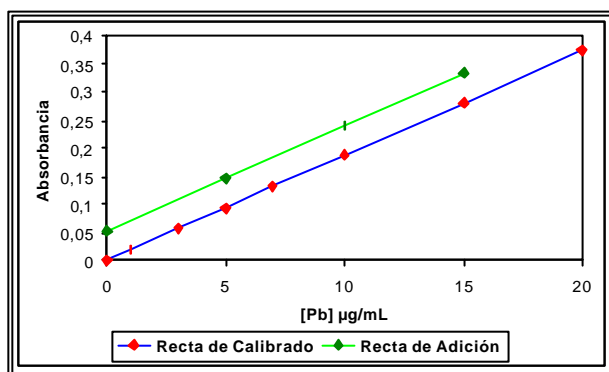


Figura 39(VIII).- Pb: Recta de Adición

$$A = 0,0187 (\text{Pb}, \mu\text{g/mL}) + 0,053;$$

$$r = 0,999$$

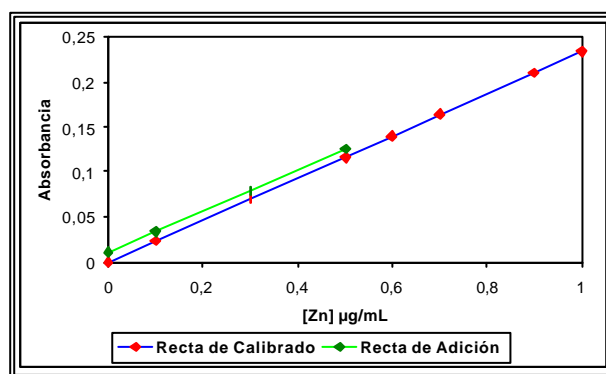


Figura 39 (IX).- Zn: Recta de Adición

$$A = 0,232 (\text{Zn}, \mu\text{g/mL}) + 0,011;$$

$$r = 0,999$$

En las Figuras 39 (I-IX), se observa que ambas rectas, de calibrado y de adición son totalmente paralelas. Este paralelismo entre ambas rectas, se comprueba estadísticamente (test t, nivel de confianza 95%) mediante el programa ULC (Univariate Linear Calibration) [208]. Por tanto, no tiene lugar ningún efecto matriz. Así, se puede calcular la concentración de los metales en las muestras utilizando la recta de calibrado.

#### 6.8.- Frecuencia de Muestreo

Se calculó la frecuencia de muestreo del método propuesto. Considerando la duración de la etapa de lixiviación y la duración de la etapa de medida (20 s). De esta manera, las frecuencias de muestreo para los distintos metales se reflejan en la Tabla XL.

Tabla XL.- Frecuencia de muestreo para la determinación de metales en humos de soldadura

	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Frecuencia de muestreo (muestras/h)	45	14	8	25	25	18	12	25	25

## 7.- APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN DE METALES EN HUMOS DE SOLDADURA

Como ya se ha mencionado en la página 102, con el objetivo de estimar la exposición de los soldadores a los metales procedentes de los humos de soldadura, se establecieron tres puntos de muestreo estáticos (ambientales) y un punto de muestreo personal. Los puntos de muestreo estáticos se establecieron a 2, 1 y 0,5 m desde la zona donde se realiza la operación de soldadura (puntos de muestreo I, II y III, respectivamente) y colocando al trabajador el aparato de muestreo, de manera que la zona de captación de aire, es decir el filtro, estuviera cerca de su nariz (punto de muestreo IV). La captación de aire se realizó a un caudal de 1,5 L/min mientras se estaba produciendo la operación de soldadura. Las muestras se tomaron por triplicado al mismo tiempo en cada uno de los puntos de muestreo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tablas XLI (1-9) y en la Figura 40.

Tabla XLI (1).- Concentración de cadmio en humos de soldadura

Puesto de trabajo muestreado: Puesto 1 Soldador. Empresa con actividad construcción metálica y calderería			
Punto de muestreo	Tiempo de muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	[Cd] media $\pm$ desviación estándar, (n=3) ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
I	90	135	N.D. <sup>1</sup>
II	90	135	N.D. <sup>1</sup>
III	90	135	0,7 $\pm$ 0,0
IV	90	135	1,7 $\pm$ 0,1
Puesto de trabajo muestreado: Puesto 2 Soldador. Empresa con actividad construcción naval			
I	90	135	N.D. <sup>1</sup>
II	90	135	N.D. <sup>1</sup>
III	90	135	0,5 $\pm$ 0,0
IV	90	135	1,3 $\pm$ 0,1

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla XLI (2).- Concentración de cobalto en humos de soldadura

Puesto de trabajo muestreado: Puesto 1 Soldador. Empresa con actividad construcción metálica y calderería			
Punto de muestreo	Tiempo de muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	[Co] media $\pm$ desviación estándar, (n=3) ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
I	90	135	N.D. <sup>1</sup>
II	90	135	2,8 $\pm$ 0,0
III	90	135	4,0 $\pm$ 0,3
IV	90	135	8,0 $\pm$ 0,3
Puesto de trabajo muestreado: Puesto 2 Soldador. Empresa con actividad construcción naval			
I	90	135	N.D. <sup>1</sup>
II	90	135	N.D. <sup>1</sup>
III	90	135	N.D. <sup>1</sup>
IV	90	135	2,8 $\pm$ 0,3

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla XLI (3).- Concentración de cromo en humos de soldadura

Puesto de trabajo muestreado: Puesto 1 Soldador. Empresa con actividad construcción metálica y calderería			
Punto de muestreo	Tiempo de muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	[Cr] media $\pm$ desviación estándar, (n=3) ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
I	30	45	10,2 $\pm$ 0,4
II	30	45	22,4 $\pm$ 0,5
III	30	45	42,1 $\pm$ 0,6
IV	30	45	91,0 $\pm$ 0,6
Puesto de trabajo muestreado: Puesto 2 Soldador. Empresa con actividad construcción naval			
I	30	45	N.D. <sup>1</sup>
II	30	45	4,7 $\pm$ 0,5
III	30	45	9,6 $\pm$ 0,6
IV	30	45	23,7 $\pm$ 0,6

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla XLI (4).- Concentración de cobre en humos de soldadura

Puesto de trabajo muestreado: Puesto 1 Soldador. Empresa con actividad construcción metálica y calderería			
Punto de muestreo	Tiempo de muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	[Cu] media $\pm$ desviación estándar, (n=3) ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
I	30	45	11,2 $\pm$ 0,5
II	30	45	39,1 $\pm$ 0,8
III	30	45	80,9 $\pm$ 0,5
IV	30	45	96,3 $\pm$ 0,8
Puesto de trabajo muestreado: Puesto 2 Soldador. Empresa con actividad construcción naval			
I	30	45	7,4 $\pm$ 0,0
II	30	45	34,5 $\pm$ 0,8
III	30	45	50,3 $\pm$ 0,9
IV	30	45	78,2 $\pm$ 0,8

Tabla XLI (5).- Concentración de hierro en humos de soldadura

Puesto de trabajo muestreado: Puesto 1 Soldador. Empresa con actividad construcción metálica y calderería			
Punto de muestreo	Tiempo de muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	[Fe] media $\pm$ desviación estándar, (n=3) ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
I	2	3	503,7 $\pm$ 8,5
II	2	3	898,8 $\pm$ 14,7
III	2	3	1495,0 $\pm$ 23,4
IV	2	3	3002,5 $\pm$ 27,1
Puesto de trabajo muestreado: Puesto 2 Soldador. Empresa con actividad construcción naval			
I	2	3	197,5 $\pm$ 8,5
II	2	3	681,5 $\pm$ 14,8
III	2	3	1022,2 $\pm$ 19,3
IV	2	3	2503,7 $\pm$ 25,3

Tabla XLI (6).- Concentración de manganeso en humos de soldadura

Puesto de trabajo muestreado: Puesto 1 Soldador. Empresa con actividad construcción metálica y calderería			
Punto de muestreo	Tiempo de muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	[Mn] media $\pm$ desviación estándar, (n=3) ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
I	10	15	49,4 $\pm$ 1,1
II	10	15	80,9 $\pm$ 1,7
III	10	15	119,6 $\pm$ 1,1
IV	10	15	194,0 $\pm$ 2,0
Puesto de trabajo muestreado: Puesto 2 Soldador. Empresa con actividad construcción naval			
I	10	15	8,5 $\pm$ 0,0
II	10	15	19,4 $\pm$ 1,1
III	10	15	30,6 $\pm$ 1,1
IV	10	15	45,7 $\pm$ 1,1

Tabla XLI (7).- Concentración de níquel en humos de soldadura

Puesto de trabajo muestreado: Puesto 1 Soldador. Empresa con actividad construcción metálica y calderería			
Punto de muestreo	Tiempo de muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	[Ni] media $\pm$ desviación estándar, (n=3) ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
I	15	22,5	N.D. <sup>1</sup>
II	15	22,5	22,0 $\pm$ 1,7
III	15	22,5	84,1 $\pm$ 1,6
IV	15	22,5	144,9 $\pm$ 2,3
Puesto de trabajo muestreado: Puesto 2 Soldador. Empresa con actividad construcción naval			
I	15	22,5	N.D. <sup>1</sup>
II	15	22,5	12,4 $\pm$ 1,6
III	15	22,5	46,8 $\pm$ 1,6
IV	15	22,5	77,3 $\pm$ 1,7

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla XLI (8).- Concentración de plomo en humos de soldadura

Puesto de trabajo muestreado: Puesto 1 Soldador. Empresa con actividad construcción metálica y calderería			
Punto de muestreo	Tiempo de muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	[Pb] media $\pm$ desviación estándar, (n=3) ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
I	90	135	N.D. <sup>1</sup>
II	90	135	N.D. <sup>1</sup>
III	90	135	N.D. <sup>1</sup>
IV	90	135	9,4 $\pm$ 0,4
Puesto de trabajo muestreado: Puesto 2 Soldador. Empresa con actividad construcción naval			
I	90	135	N.D. <sup>1</sup>
II	90	135	10,0 $\pm$ 0,5
III	90	135	29,2 $\pm$ 0,5
IV	90	135	42,7 $\pm$ 0,8

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla XLI (9).- Concentración de cinc en humos de soldadura

Puesto de trabajo muestreado: Soldador. Empresa con actividad construcción metálica y calderería			
Punto de muestreo	Tiempo de muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	[Zn] media $\pm$ desviación estándar, (n=3) ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
I	2	3	21,3 $\pm$ 1,7
II	2	3	35,8 $\pm$ 1,7
III	2	3	75,4 $\pm$ 1,5
IV	2	3	147,5 $\pm$ 1,3
Puesto de trabajo muestreado: Soldador. Empresa con actividad construcción naval			
I	2	3	16,4 $\pm$ 1,7
II	2	3	32,9 $\pm$ 1,6
III	2	3	53,2 $\pm$ 1,5
IV	2	3	82,2 $\pm$ 1,4

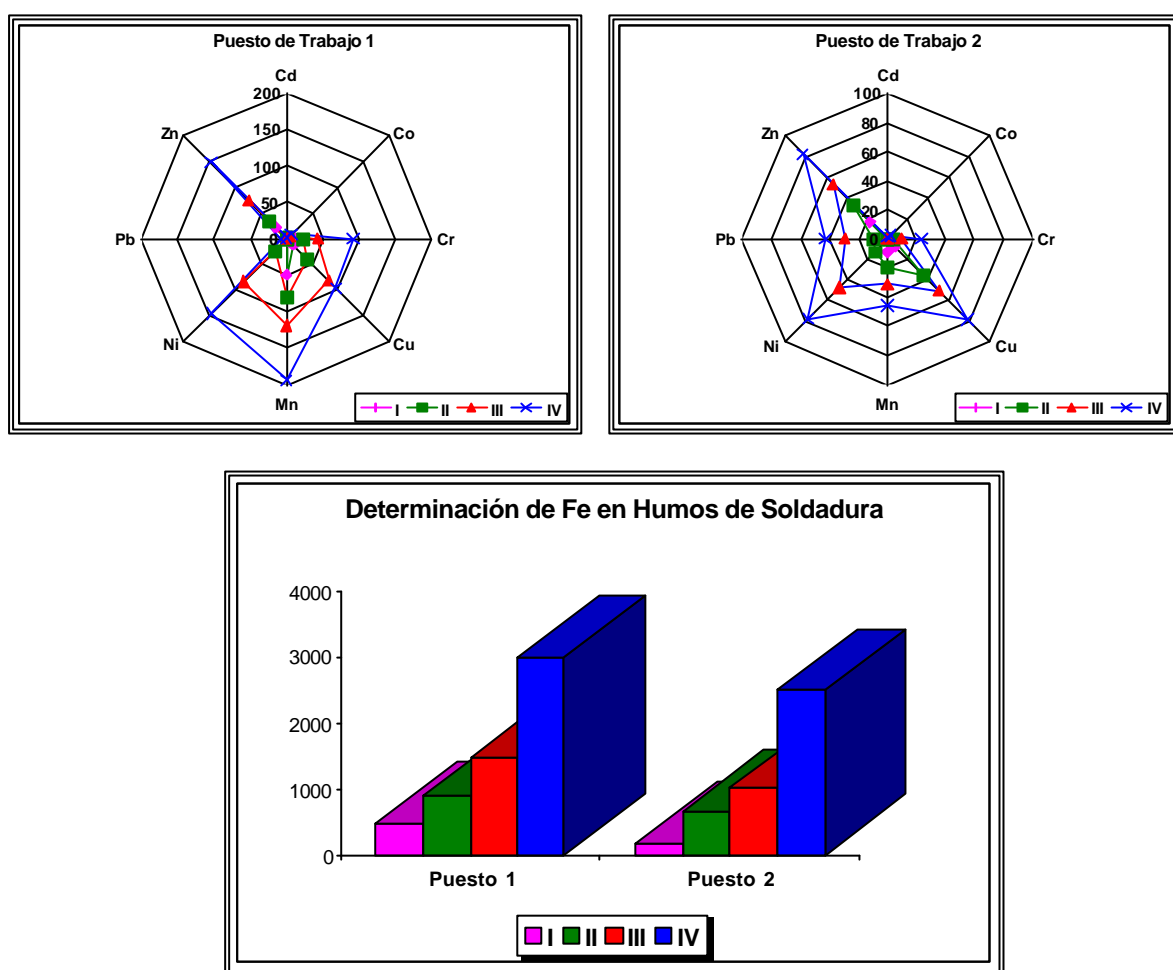


Figura 40.- Concentración de metales en humos de soldadura

En las Tablas XLI (1-9) y en la Figura 40 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las muestras de aire analizadas en los dos puestos de trabajo muestreados. En ambos casos en el punto de muestreo IV (cerca de la nariz del soldador) es donde se localizan las concentraciones más altas de los metales. Por el contrario, en el punto de muestreo I situado a 2 m de donde se realiza la operación de soldadura, las concentraciones de los metales son las más bajas. En todos los casos, excepto para el Pb, las concentraciones de los metales son mayores en el puesto de trabajo 1.

En algunos puntos de muestreo (los más alejados de donde se realiza el proceso de soldadura) el cadmio, cobalto, cromo, níquel y plomo se encuentran en concentraciones por debajo de los límites de detección, y en el caso de cadmio y cobalto, estos metales se encuentran en el aire del medio ambiente laboral a niveles próximos a los límites de cuantificación del método.



## 8.- EVALUACIÓN DEL RIESGO HIGIÉNICO

### 8.1.-Para Cada Metal

Se procede a determinar el porcentaje de "Dosis Máxima Permisible" (%DMP) a partir de la expresión:

$$\%DMP = \frac{C_i}{VLA - ED} \times \frac{t}{8} \times 100 = K$$

Donde:

- t (tiempo de exposición diario)
- VLA-ED: Valores en Tabla IV, p. 24
- $C_i$ : Concentración de cada metal

Resultando que: si  $K > 100$  Existe riesgo higiénico  
 si  $K < 50$  No existe riesgo higiénico  
 si  $50 < K < 100$  Existe riesgo higiénico dudoso

Tabla XLII.- Cálculo de la dosis máxima permisible (%DMP) para cada metal

	Tiempo de Exposición (h)	<sup>1</sup> VLA-ED (mg/m <sup>3</sup> )	<sup>2</sup> $C_i$ (mg/m <sup>3</sup> )	% DMP
Cd	6	Cd elemental y compuestos: Fracción respirable <sup>3</sup> : 0,002	0,0017	63,8
Co	6	Co elemental y compuestos inorgánicos (fracción respirable) <sup>3</sup> : 0,02	0,008	30,0
Cr	6	Óxido de Cr: 0,5	0,091	13,7
Cu	6	Óxido de cobre (humos): 0,2	0,0963	36,1
Fe	6	Óxido de Fe(III): 5	3,0025	45,1
Mn	6	Manganeso: Compuestos Inorgánicos: 0,2	0,194	72,8
Ni	6	Níquel: Compuestos Insolubles: 0,2	0,1449	54,3
Pb	6	Plomo inorgánico y derivados: 0,15	0,0427	21,4
Zn	6	Óxido de cinc (humos): 5	0,1475	2,2

<sup>1</sup> VLA-ED: Valor límite ambiental-exposición diaria

<sup>2</sup>  $C_i$ : Concentración de cada metal en el punto de muestreo personal (punto IV). Se tomó la concentración más alta encontrada

<sup>3</sup> Se considera la fracción respirable (partículas capaces de alcanzar la región alveolar), ya que las partículas incluidas en los humos de soldadura presentan diámetros < de 1 µm, y la fracción respirable incluye partículas con diámetros < de 5 µm, mientras que la fracción inhalable (partículas capaces de penetrar en el aparato respiratorio) incluyen partículas con tamaños < de 10 µm

Como el %DMP (K) nunca es mayor que 100, no existe riesgo higiénico para ninguno de los metales. Sin embargo, para el cadmio, manganeso y níquel el %DMP > 50, por lo que según estos existe riesgo higiénico dudoso. Por tanto, se deberían realizar mediciones higiénicas de estos metales de manera periódica para controlar que el valor de K no se incrementa [209].

Además, se observa que las concentraciones de todos los metales en todos los puntos de muestreo son menores que los VLA-ED (Tabla IV, p. 24).

## 8.2.-Considerando Todos los Metales

En este caso se considera que los efectos para la salud del trabajador son aditivos, ya que la inhalación de polvo o humos metálicos puede originar fiebre de humos metálicos. En este caso se calculará el valor de K de la siguiente forma:

$$\frac{C_1}{VLA_1} + \frac{C_2}{VLA_2} + \frac{C_3}{VLA_3} + \dots + \frac{C_n}{VLA_n} = K$$

Donde:

- $VLA_n$ : Valores en Tabla IV, p. 24
- $C_n$ : Concentración de cada metal

Resultando que: si  $K > 1$  Existe riesgo higiénico

si  $K < 0,5$  No existe riesgo higiénico

si  $0,5 \leq K \leq 1$  Existe riesgo higiénico dudoso

El valor de K así obtenido fue de 4,5: luego existe riesgo higiénico.



**Capítulo IV.-**  
***Parte Experimental 2:***  
***Determinación de Cr(VI) en Humos***  
***de Soldadura***



## DETERMINACIÓN DE CROMO HEXAVALENTE EN HUMOS DE SOLDADURA

Para realizar la determinación de Cr(VI) total en humos de soldadura, se deben cumplir tres condiciones:

- la disolución extractante debe disolver todas las formas químicas en las que se pueda encontrar el Cr(VI).
- las condiciones en las que se realiza la extracción no deben producir la reducción del Cr(VI) a Cr(III).
- las condiciones en las que se realiza la extracción no deben producir la oxidación del Cr(III) a Cr(VI).

Estos criterios se cumplen si se realiza la extracción alcalina del Cr(VI) del filtro de captación de aire en un medio tamponado. Así, para la determinación de Cr(VI) soluble en agua se recomienda utilizar el medio tamponado  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-NH}_3$  (pH 8) [114]. Sin embargo, cuando se desea cuantificar el Cr(VI) total se recomienda el uso del sistema regulador 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -2%  $\text{NaHCO}_3$  (pH 11) [111, 112-113]. Por tanto, para realizar este trabajo ha sido ésta la disolución extractante elegida para extraer el Cr(VI) de los filtros de captación de aire.

También hay que tener en cuenta que debe de asegurarse la completa separación de Cr(III) del Cr(VI), ya que la técnica de detección utilizada (FAAS) no distingue entre ambos estados de oxidación del cromo. Con este objetivo y con el de realizar un incremento de la sensibilidad de la metodología analítica, se suele incorporar una técnica de separación haciendo uso de una minicolumna conteniendo una resina aniónica. En este sentido, el cambiador de iones más utilizado ha sido la resina aniónica Dowex 1-X8 (Sigma-Aldrich) [191, 210-212]. Esta resina aniónica se comercializa con un tamaño de partícula entre 20-50 mesh y con grupos Cl. En este trabajo, se selecciona el tamaño de partícula más pequeño (20 mesh), ya que según se ha demostrado, esto favorece el proceso de preconcentración [213-214]. Antes de utilizarla se debe lavar con HCl 3 M (se mantienen en contacto 10 min con el ácido con agitación). Después, se elimina el ácido y se repite el proceso dos veces. Por último, se lava con HCl 1 M y se seca antes de utilizarse. En este

tipo de resina la elución del Cr(VI) se realiza utilizando una disolución que contenga algún anión ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{KSCN}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ) en concentración relativamente alta (1 ó 2 M) [215]. Sin embargo, se ha demostrado que la utilización de disoluciones de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 8-10%, o de mezclas  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y  $\text{NaHCO}_3$  es más efectiva que el uso de sales para eluir al Cr(VI) [216], ya que estas disoluciones combinan elevada basicidad con una elevada concentración de anión. Como la presencia de elevadas concentraciones de sodio puede distorsionar la llama del espectrofotómetro de absorción atómica haciendo oscilar la señal analítica, el eluyente que se ha elegido para eluir al Cr(VI) es el que proponen Wang y col. [191]: 0,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,1 M  $\text{NH}_3$  (pH 8,3) (Merck).

## 1.- OPTIMIZACIÓN DE LA PRECONCENTRACIÓN ON-LINE DEL Cr(VI): DISEÑOS EXPERIMENTALES

Preparación de la minicolumna: Para elaborar la minicolumna conteniendo la resina aniónica Dowex 1-X8 se prepara una suspensión de la resina (50 mg, 20 mesh) en agua y con ayuda de una jeringa se inserta en la columna (tubo de Tygon de 1,1 mm d.i.) a la que previamente se le ha añadido lana de vidrio en uno de sus extremos. Una vez que se ha empaquetado con la resina, se sella también el otro extremo con lana de vidrio para que la resina quede retenida dentro de la minicolumna. En estas condiciones, las dimensiones de la minicolumna son 100 x 1,1 mm d.i. (Figura 41).

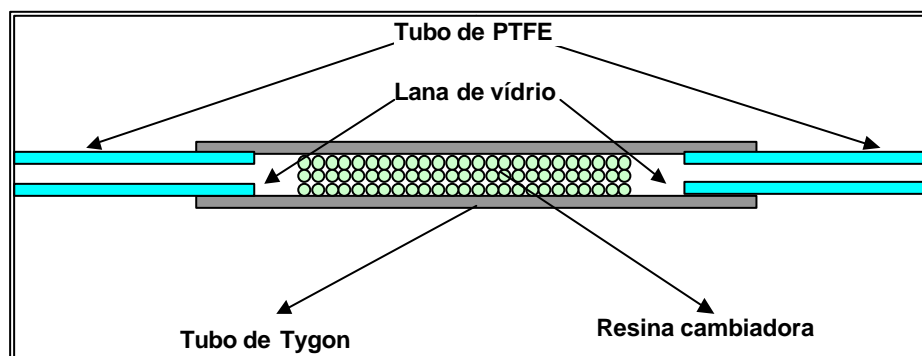


Figura 41.- Diseño de la minicolumna conteniendo la resina Dowex 1-X8

Esta minicolumna se inserta en un sistema FIA de preconcentración (Figura 42). Dentro de este dispositivo se inserta en el bucle de la válvula de inyección de preconcentración (VIP). En este sistema la matriz de la muestra no llega al detector (va al desecho) y durante la etapa de carga de la resina, lo que llega al detector es agua ultrapura.

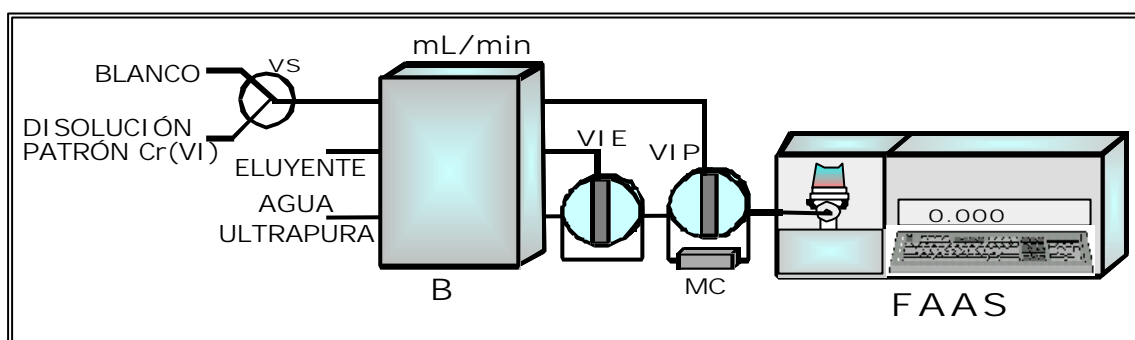


Figura 42.- Dispositivo FIA de preconcentración. B, bomba peristáltica; VS, válvula de selección; VIE, válvula de inyección para inyectar el eluyente en el sistema; VIP, válvula de inyección de preconcentración; MC, minicolumna; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama

### 1.1. Diseño de Screening

Las variables implicadas en el proceso de preconcentración realizado con un dispositivo FIA como el reflejado en la Figura 42 que se optimizaron fueron cuatro:

- ❖ pH de la muestra (disolución patrón de Cr(VI))
- ❖ Caudal de muestreo
- ❖ Caudal de elución (caudal del agua ultrapura)
- ❖ Volumen de eluyente (0,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,1 M  $\text{NH}_3$  (pH 8,3).

Los valores máximos y mínimos para estas variables fueron seleccionados en función de experimentos realizados en estudios previos (Tabla XLIII).

Tabla XLIII.- Preconcentración de Cr(VI): variables y niveles considerados para el diseño factorial de screening

VARIABLE	CLAVE	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
pH de la muestra	A	4	12
Caudal de muestreo	B	1,0 mL/min	4,0 mL/min
Caudal de elución	C	2,0 mL/min	3,5 mL/min
Volumen de eluyente	D	90 $\mu$ L	250 $\mu$ L

El diseño factorial aplicado es el de Fracción 1/2 ( $2^{4-1}$ ) que implica realizar 9 experimentos que fueron aleatorizados para evitar errores de sistema (Statgraphics Plus v.5.1). En este diseño se ha considerado un punto central en el que las variables toman un valor medio entre el límite superior e inferior. La Tabla XLIV recoge la matriz correspondiente a este diseño factorial con los 9 experimentos a realizar para la optimización del proceso.

- |   |                       |
|---|-----------------------|
| - Tipo de Diseño: Screening                                       |                       |
| - Nombre del Diseño: Nombre de Diseño: Fracción 1/2 ( $2^{4-1}$ ) |                       |
| - Número de factores experimentales: 4                            |                       |
| - Número de respuestas: 1   |                       |
| - Número de experimentos: 9                                       | - Puntos centrales: 1 |
| - Error grados de libertad: 1                                     | - Aleatorio: Si       |



Tabla XLIV.- Matriz del diseño fracción  $1/2 \cdot 2^{4-1}$  en el que se obtienen 9 experimentos para las cuatro variables implicadas

Experimento	Variables Codificadas			
	A	B	C	D
1	12,0	1,0	2,0	250,0
2	4,0	4,0	2,0	250,0
3	12,0	1,0	3,5	90,0
4	8,0	2,5	2,8	170,0
5	4,0	1,0	2,0	90,0
6	4,0	4,0	3,5	90,0
7	12,0	4,0	3,5	250,0
8	12,0	4,0	2,0	90,0
9	4,0	1,0	3,5	250,0

Una vez obtenida esta matriz, se realizaron los experimentos fijados por la misma. El diseño factorial se aplicó a 2 mL de disoluciones de Cr(VI) con una concentración de 0,1 µg/mL (0,2 µg). La variable respuesta (% Recuperación) se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{A}{B} \times 100$$

Siendo:

A: concentración de Cr(VI) obtenida experimentalmente

B: concentración de Cr(VI) pasada por la resina

Los % de Recuperación obtenidos por duplicado y expresados como la media de los dos valores calculados obtenidos para cada experimento del diseño se muestran en la Tabla XLV.

Tabla XLV.- Matriz del diseño fracción  $1/2 \cdot 2^{4-1}$  para las cuatro variables implicadas con sus correspondientes valores del % recuperación de cada experimento

Experimento	Variables Codificadas				% Recuperación
	A	B	C	D	
1	12,0	1,0	2,0	250,0	99,7
2	4,0	4,0	2,0	250,0	77,0
3	12,0	1,0	3,5	90,0	78,5
4	8,0	2,5	2,8	170,0	97,4
5	4,0	1,0	2,0	90,0	83,4
6	4,0	4,0	3,5	90,0	60,1
7	12,0	4,0	3,5	250,0	85,3
8	12,0	4,0	2,0	90,0	64,4
9	4,0	1,0	3,5	250,0	96,0

Una vez obtenidos los datos experimentales se procede al análisis correspondiente. En principio es necesario conocer qué variables son significativas, es decir, aquellas que van a tener una gran influencia sobre el % de Recuperación, para ello se recurre a la Carta Pareto estandarizada (Figura 43).

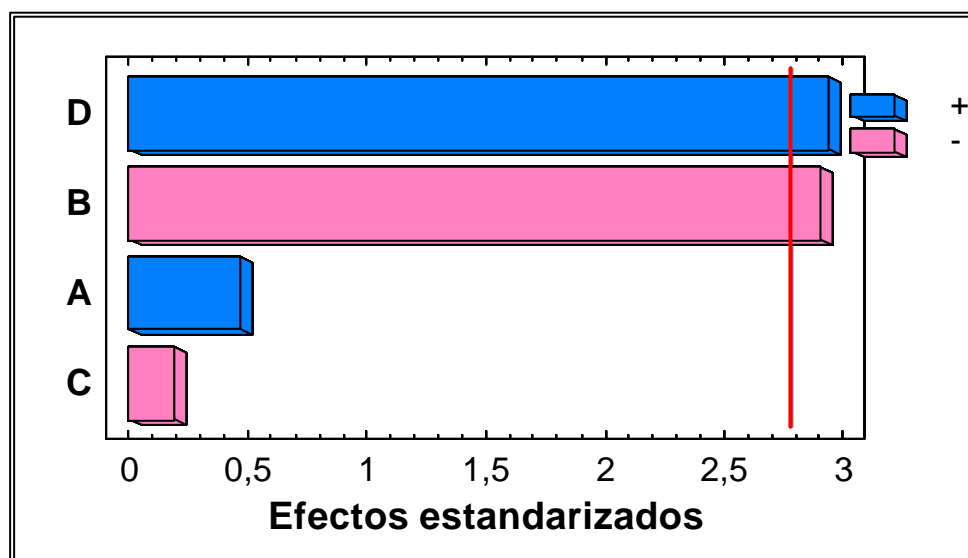


Figura 43.- Preconcentración de Cr(VI). Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, pH de la muestra; B, caudal de muestreo; C, caudal de elución; D, volumen de eluyente

El valor de los efectos estimados en las Cartas Pareto para cada una de las variables se indican en la Tabla XLVI.

Tabla XLVI.- Efectos estimados de cada una de las variables estudiadas

VARIABLE	EFFECTO ESTIMADO
pH de la muestra (A)	2,9
Caudal de muestreo (B)	-17,7
Caudal de elución (C)	-1,2
Volumen de eluyente (D)	17,9

En la Figura 44 se representa mediante líneas la influencia de los efectos principales en la etapa de preconcentración de Cr(VI).

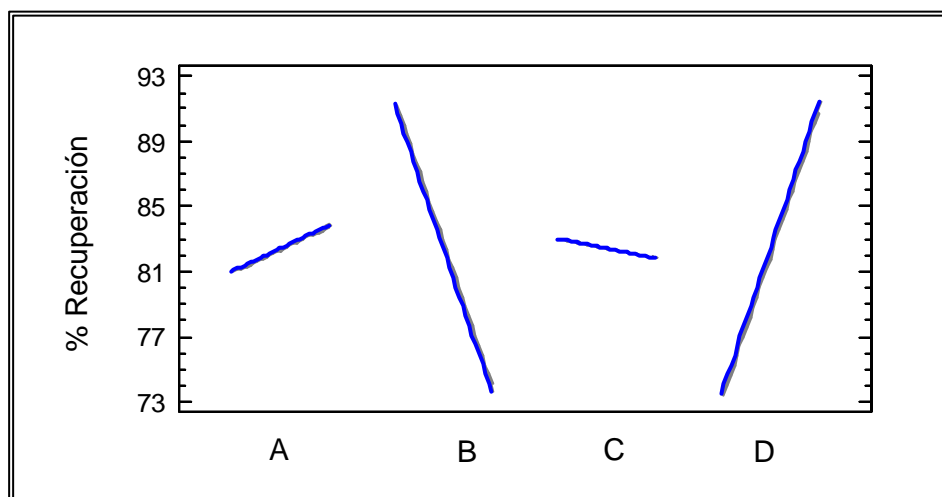


Fig. 44.- Representación de los efectos principales de las cuatro variables que afectan al proceso de preconcentración de Cr(VI). A, pH de la muestra; B, caudal de muestreo; C, caudal de elución; D, volumen de eluyente

#### 1.1.1.- Conclusiones del diseño de screening

A partir de la carta Pareto (Figura 43) y de la representación de los efectos principales (Figura 44) se establecen las siguientes conclusiones:

\* pH de la muestra: No es una variable estadísticamente significativa y presenta un efecto estimado positivo, lo que indica que el % de recuperación de Cr(VI) es directamente proporcional a dicho factor.

\* Caudal de muestreo: Es una variable estadísticamente significativa con efecto estimado negativo para el proceso de preconcentración de Cr(VI).

\* Caudal de elución: No es una variable estadísticamente significativa y presenta un efecto estimado negativo, lo que indica que el % de recuperación de Cr(VI) es inversamente proporcional a dicho factor.

\* Volumen de eluyente: Es una variable estadísticamente significativa con efecto estimado positivo para el proceso de preconcentración de Cr(VI).

Debido a que el diseño factorial de screening no permite la evaluación directa de los términos de interacción entre dos o más factores, se eliminaron del sistema aquellos factores que eran considerados originalmente, pero que no parecían tener influencia sobre el mismo en el intervalo estudiado: pH de la muestra y caudal de elución. Así, se reevaluó el modelo ahora reducido, pudiéndose considerar las interacciones de segundo orden. La Figura 45 recoge los resultados obtenidos. Como se muestra en esta figura, ninguna interacción de segundo orden es estadísticamente significativa, por lo que se puede variar el valor de una de estas variables sin que se vea afectado el valor de cualquier otra.

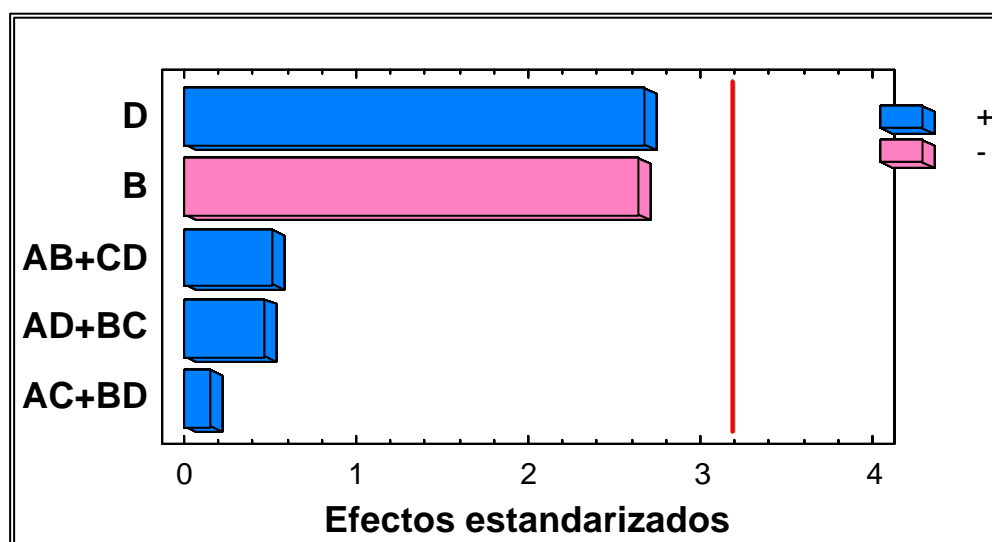


Fig. 45.- Carta Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, pH de la muestra; B, caudal de muestreo; C, caudal de elución; D, volumen de eluyente

Todo lo concluido a partir de la Carta Pareto se corrobora con las gráficas de superficie de respuesta que proporciona el análisis de screening. En estas gráficas, se representa una variable frente a otra y mediante una superficie se indica la tendencia del sistema hacia el óptimo del proceso. De esta forma, se demuestra el máximo % de Recuperación se obtiene para el valor máximo estudiado para el volumen de eluyente (250  $\mu\text{L}$ ) y el mínimo caudal de muestreo probado (1mL/min) (Figura 46).

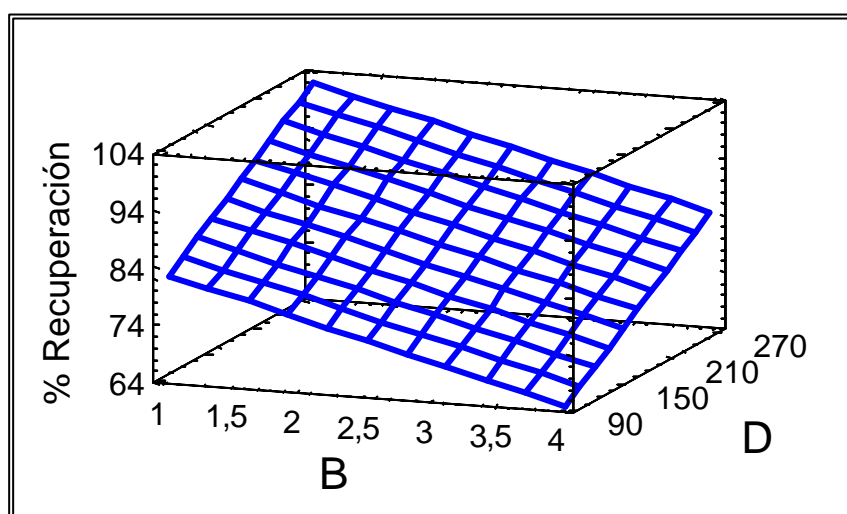


Figura 46.- Superficie de respuesta proporcionadas por el diseño de screening (diseño fracción 1/2): B, caudal de muestreo; D, volumen de eluyente. Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño

Después de haber realizado el análisis de los resultados obtenidos al aplicar el diseño de screening, los valores optimizados para cada una de las variables serían los recogidos en la Tabla XLVII.

Tabla XLVII.- Condiciones establecidas para cada variable según el diseño de screening (diseño fracción 1/2)

VARIABLE	VALORES ESTABLECIDOS POR EL DISEÑO
pH de la muestra	12
Caudal de muestreo (mL/min)	1
Caudal de elución (mL/min)	2
Volumen de eluyente ( $\mu\text{L}$ )	250

### 1.2. Diseño de Superficie de Respuesta

Como los diseños de screening no proporcionan el valor óptimo de cada una de las variables que determinan el sistema, sino que este tipo de diseños indican las tendencias de cada una de ellas hacia el mismo, se procedió a utilizar un diseño factorial de superficie de respuesta.

Antes de realizar el diseño factorial de superficie de respuesta, se tuvo en cuenta lo siguiente para cada variable:

- *pH de la muestra*: El diseño de screening establece un efecto estimado positivo para esta variable. Como cuando se realice la extracción alcalina del Cr(VI) del filtro de captación de aire, el extracto tendrá pH 11, se puede considerar este valor como óptimo para que el Cr(VI) sea retenido en la minicolumna conteniendo la resina aniónica Dowex 1-X8.
- *Caudal de elución*: El diseño de screening establece para esta variable un efecto estimado negativo, pero bastante pequeño (-1,2). Si además se tiene en cuenta que en el experimento nº 9 del diseño de screening (Tabla XLV) se obtiene un % Recuperación cuantitativo utilizando un caudal de 3,5 mL/min (96,0%), se podría tomar como valor óptimo este caudal, y así incrementar la sensibilidad de la metodología analítica. Por tanto, éste fue el valor tomado para esta variable.

Así, con el objetivo de afinar el valor óptimo del caudal de muestreo y del volumen de eluyente, se procedió a realizar un diseño factorial de superficie de respuesta. La Tabla XLVIII expone los valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta. Los valores máximo y mínimo establecidos para cada variable se han elegido en función de estudios previos y de los resultados obtenidos anteriormente en el diseño de screening.

Tabla XLVIII.- Valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta

VARIABLE	CLAVE	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
Caudal de muestreo	B	1,0 mL/min	2,5 mL/min
Volumen de eluyente	D	150 $\mu$ L	250 $\mu$ L

El diseño factorial aplicado de superficie de respuesta es un diseño central composicional  $2^2$  + estrella que implica realizar 10 experimentos (Statgraphics Plus 5.1). Las características del diseño son las siguientes:

- Tipo de Diseño: Superficie de respuesta
- Nombre del Diseño: Central Composicional  $2^2$  + estrella
- Características del diseño: ortogonal
- Número de factores experimentales: 2
- Puntos centrales: 2
- Número de experimentos: 10
- Error grados de libertad: 4
- Aleatorio: Si
- Distancia axial,  $\alpha = 1,07809$

La Tabla XLIX muestra la matriz experimental del diseño incluyendo la variable respuesta (% Recuperación) obtenida para cada experimento (por duplicado).

Tabla XLIX.- Matriz del diseño central composicional  $2^2$  + estrella con sus correspondientes valores del % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del Cr(VI). B, caudal de muestreo; D, volumen de eluyente

Experimento	B	D	% Recuperación
1	2,5	150	96,8
2	1,8	200	97,1
3	2,5	250	96,8
4	1,8	200	98,9
5	1,0	200	97,9
6	1,0	250	97,1
7	1,0	150	96,8
8	1,8	146	96,9
9	1,8	254	99,0
10	2,6	200	97,1

## 1.2.1.- Conclusiones del diseño de superficie de respuesta

El análisis de los resultados de la Tabla XLIX da lugar a la Carta Pareto que se muestra en la Figura 47. Como se puede observar, ninguna de las variables es estadísticamente significativa. El caudal de muestreo presenta un efecto estimado negativo (-0,4) y el volumen de eluyente un efecto estimado positivo (0,8). Es decir, el % de Recuperación es directamente proporcional al volumen de eluyente (D) e inversamente proporcional al caudal de muestreo (B).

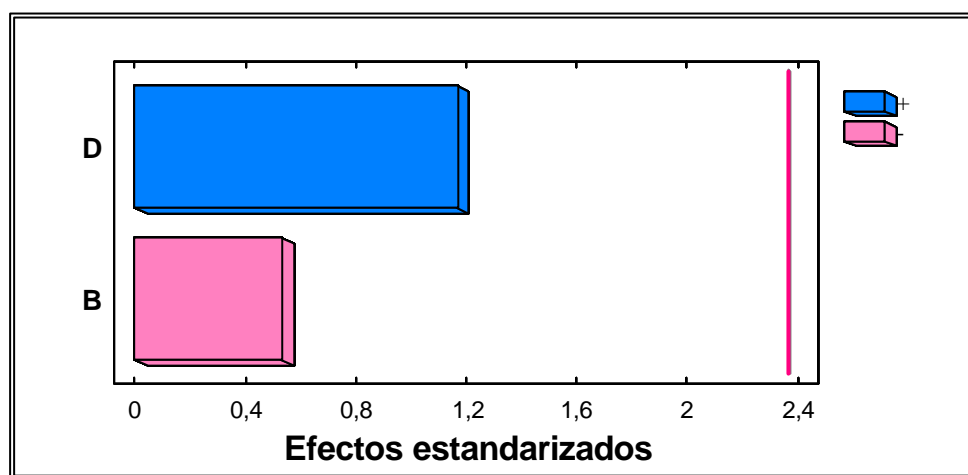


Figura 47.- Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. B, caudal de muestreo; D, volumen de eluyente

La Figura 48 muestra la superficie de respuesta estimada obtenida por el modelo experimental para las variables estudiadas: B, caudal de muestreo; D, volumen de eluyente.

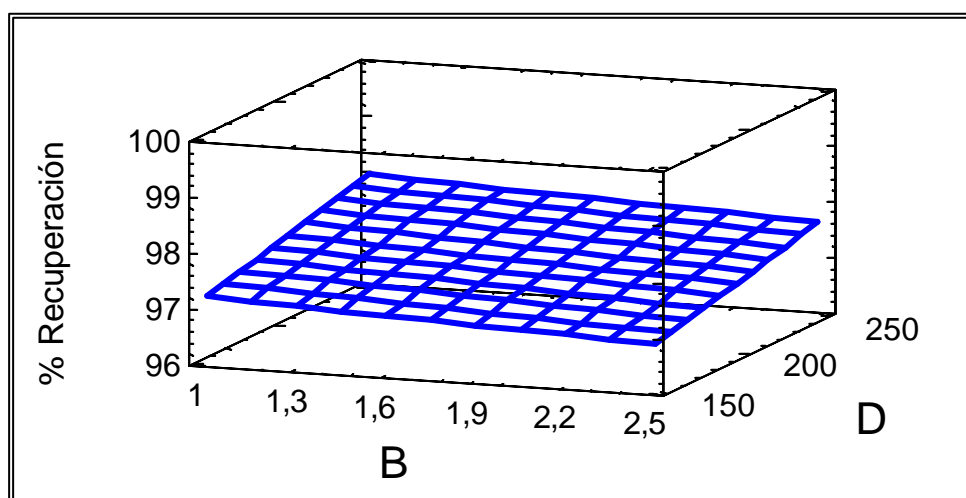


Figura 48.- Superficie de respuesta para el modelo. B, caudal de muestreo; D, volumen de eluyente



A la vista de la superficie de respuesta (Figura 48), se encuentran los valores óptimos de las variables dentro de los intervalos de trabajo que previamente se habían fijado. Estos valores óptimos son:

B, caudal de muestreo: 2,5 mL/min

D, volumen de eluyente: 150  $\mu$ L

Estos valores se eligieron con el objetivo de alcanzar un % Recuperación cuantitativo (mayor que un 95 %) en el menor tiempo. Esto es para conseguir que la frecuencia de muestreo sea lo más elevada posible, y para lograr la mayor sensibilidad, es decir el mayor factor de preconcentración, el cual se alcanza utilizando la menor cantidad posible de volumen de eluyente.

Como en el diseño de superficie de respuesta el menor volumen de eluyente estudiado fue de 150  $\mu$ L, se estudió la posibilidad de reducirlo. De esta manera, se estudiaron volúmenes más pequeños (135  $\mu$ L), los resultados obtenidos demostraron que si se reducía el volumen de eluyente el % de Recuperación dejaba de ser cuantitativo (91,7%). De la misma manera, se comprobó que al aumentar el caudal de muestra se reducía el % de Recuperación. Por ejemplo un caudal de 3,0 mL/min disminuyó el % de Recuperación hasta un 87,9 %.

En resumen, los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso de preconcentración continua de Cr(VI) se muestran en la Tabla L.

Tabla L- Valores óptimos para las variables implicadas en el proceso de preconcentración continua del Cr(VI)

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS
pH de la muestra	11
Caudal de muestreo (mL/min)	2,5
Caudal de elución (mL/min)	3,5
Volumen de eluyente ( $\mu$ L)	150

## 2. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA LIXIVIACIÓN DEL CROMO HEXAVALENTE CONTENIDO EN EL FILTRO DE CAPTACIÓN DE AIRE EN EL SISTEMA FIA: DISEÑOS EXPERIMENTALES

Este estudio se ha enfocado en la extracción, preconcentración y determinación de Cr(VI) en los filtros de captación de aire. Para ello, se ha diseñado un dispositivo FIA en el que se pueden distinguir tres etapas fundamentales:

- Lixiviación alcalina continua del filtro en una columna de pequeñas dimensiones (la misma que se ha utilizado para la determinación de metales en humos de soldadura, p. 106).
- Conducción del lixiviado obtenido al sistema de preconcentración continuo (cambiador aniónico, Dowex 1-X8, contenido en una minicolumna).
- Elución del Cr(VI) y detección continua por FAAS.

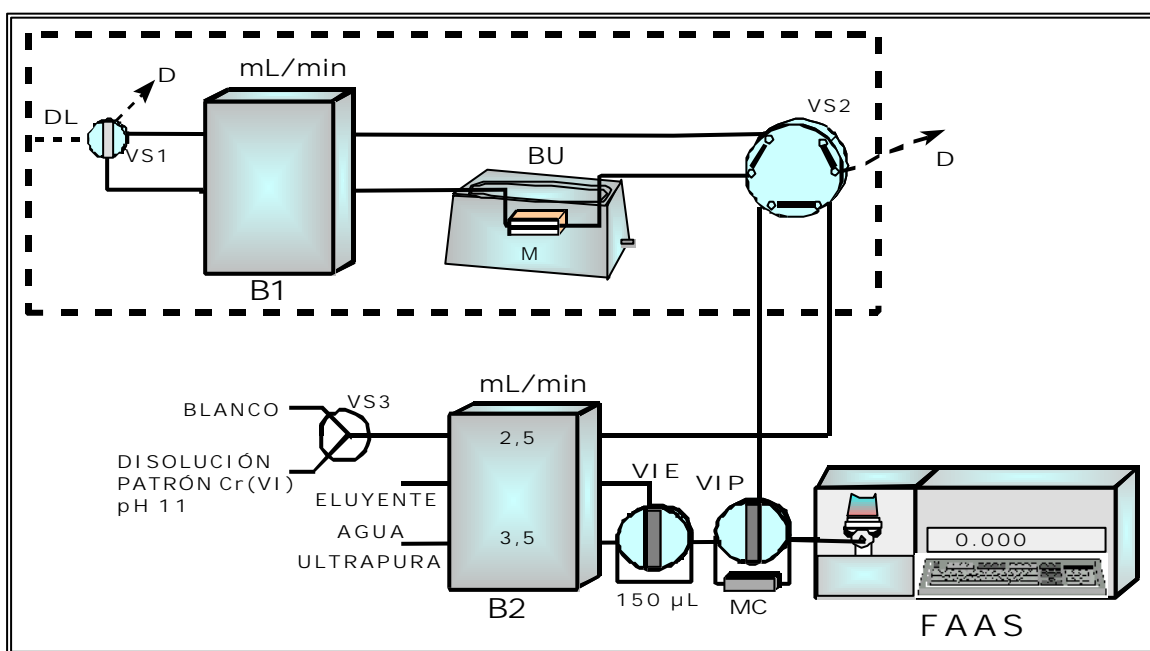


Figura 49.- Sistema FIA usado para la determinación de Cr(VI) en los filtros de captación de aire. D, desecho; B1 y B2, bombas peristálticas; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VIE, válvula de inyección de eluyente; VIP, válvula de inyección de preconcentración; MC, minicolumna conteniendo la resina aniónica Dowex 1-X8; DL, disolución lixivante; BU, baño de ultrasonidos; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama

Una vez optimizado el sistema de preconcentración, éste se incorpora en el sistema continuo de extracción alcalina de Cr(VI) (Figura 49).

La bomba peristáltica (B1) impulsa la disolución lixiviante (10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -2%  $\text{NaHCO}_3$ , pH 11) hacia el circuito que una vez lleno, se cierra mediante la VS1. Esta disolución se mantiene durante un cierto tiempo y a una determinada temperatura en contacto con la muestra y bajo la acción de la energía de ultrasonidos. Mientras se mantiene la disolución lixiviante en contacto con el filtro para que se produzca la lixiviación alcalina del Cr(VI), el bombeo se irá alternando en ambos sentidos para evitar las obstrucciones en el sistema por compactación del filtro en uno de los extremos de la minicolumna. Transcurrido el tiempo de lixiviación, se gira la válvula de selección (VS2) de modo que el lixiviado pasa a la parte del sistema FIA que lo conducirá al sistema de preconcentración, mientras que la disolución blanco pasa al desecho y al detector le llega agua ultrapura. Una vez que el extracto alcalino haya pasado por la resina a 2,5 mL/min, se gira la VIP y la VIE, de manera que se inyecta el eluyente (150  $\mu\text{L}$  de una disolución 0,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,1 M  $\text{NH}_3$ , pH 8,3) sobre un líquido portador (agua ultrapura). Este eluyente pasa por la minicolumna situada en VIP y eluye al Cr(VI) a 3,5 mL/min, siendo después transportado hacia el detector (espectrofotómetro de absorción atómica con llama).

### 2.1. Diseño de Screening

Las variables a optimizar fueron cuatro:

- ❖ Temperatura de lixiviación
- ❖ Tiempo de sonicación
- ❖ Caudal de lixiviación
- ❖ Volumen de lixiviante (10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -2%  $\text{NaHCO}_3$ )

Los valores máximos y mínimos para estas variables fueron seleccionados en función de experimentos realizados en estudios previos (Tabla LI).

Tabla LI.- Variables y niveles considerados para el diseño factorial de screening para el proceso de extracción del Cr(VI)

VARIABLE	CLAVE	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
Temperatura de lixiviación	A	20 °C	70 °C
Tiempo de sonicación	B	0,5 min	5 min
Caudal de lixiviación	C	3 mL/min	6 mL/min
Volumen de lixivante	D	2 mL	5 mL

El diseño factorial aplicado es el de Fracción 1/2 ( $2^4-1$ ) que implica realizar 9 experimentos que fueron aleatorizados para evitar errores de sistema (Statgraphics Plus v.5.1). En este diseño se ha considerado un punto central en el que las variables toman un valor medio entre el límite superior e inferior. La Tabla LII recoge la matriz correspondiente a este diseño factorial con los 9 experimentos a realizar para la optimización del proceso.

- Tipo de Diseño: Screening	
- Nombre del Diseño: Nombre de Diseño: Fracción 1/2 ( $2^4-1$ )	
- Número de factores experimentales: 4	
- Número de respuestas: 1	
- Número de experimentos: 9	- Puntos centrales: 1
- Error grados de libertad: 1	- Aleatorio: Si

Tabla LII.- Matriz del Diseño fracción  $1/2 \cdot 2^{4-1}$  en el que se obtienen 9 experimentos para las cuatro variables implicadas en la extracción de Cr(VI)

Experimento	Variables Codificadas			
	A	B	C	D
1	70,0	5,0	3,0	2,0
2	70,0	5,0	6,0	5,0
3	45,0	2,75	4,5	3,5
4	20,0	0,5	6,0	5,0
5	20,0	0,5	3,0	2,0
6	70,0	0,5	6,0	2,0
7	20,0	5,0	3,0	5,0
8	70,0	0,5	3,0	5,0
9	20,0	5,0	6,0	2,0

Una vez obtenida esta matriz, se realizaron los experimentos fijados por la misma. El diseño factorial se aplicó a muestras tomadas en el punto de muestreo IV (lugar donde se piensa que la [Cr(VI)] es mayor) en un puesto de trabajo de soldador (empresa con actividad construcción metálica y calderería).

La concentración de Cr(VI) en el punto de muestreo IV también se determinó mediante un método oficial (método establecido por la NIOSH [112]). La concentración así determinada fue de  $1,48 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ( $n=6$ ). Además, esto permitió comprobar la homogeneidad de las muestras calculando el coeficiente de variación (CV) que resultó ser de 3,4 %. Como el CV obtenido es menor del 10%, se pueden considerar como aceptables para considerar homogéneas las muestras obtenidas con diferentes bombas al mismo tiempo (muestreando un volumen de 300 L de aire a un caudal de 2,0 L/min y mismas características de proceso de soldadura).

La variable respuesta (% Eficacia en la Extracción) se calculó de la siguiente manera:

$\% \text{ Eficacia en la extracción} = \frac{[\text{Cr(VI)}] \text{ determinada por el método propuesto}}{[\text{Cr(VI)}] \text{ determinada por el método oficial}} \times 100$
---

Los % de Eficacia en la Extracción obtenidos por duplicado y expresados como la media de los dos valores calculados obtenidos para cada experimento del diseño se muestran en la Tabla LIII.

Tabla LIII.- Matriz del diseño fracción  $1/2 \cdot 2^{4-1}$  en el que se obtienen 9 experimentos para las cuatro variables implicadas en la extracción de Cr(VI) con sus correspondientes valores del % eficacia en la extracción de cada experimento

Experimento	Variables Codificadas				% Eficacia en la Extracción
	A	B	C	D	
1	70,0	5,0	3,0	2,0	95,5
2	70,0	5,0	6,0	5,0	98,3
3	45,0	2,75	4,5	3,5	79,8
4	20,0	0,5	6,0	5,0	70,2
5	20,0	0,5	3,0	2,0	59,8
6	70,0	0,5	6,0	2,0	83,7
7	20,0	5,0	3,0	5,0	78,7
8	70,0	0,5	3,0	5,0	67,8
9	20,0	5,0	6,0	2,0	74,8

Una vez obtenidos los datos experimentales se procede al análisis correspondiente. Para conocer qué variables son significativas, es decir aquellas que van a tener una gran influencia sobre el % Eficacia en la Extracción del Cr(VI), se recurre a la Carta Pareto estandarizada (Figura 50).

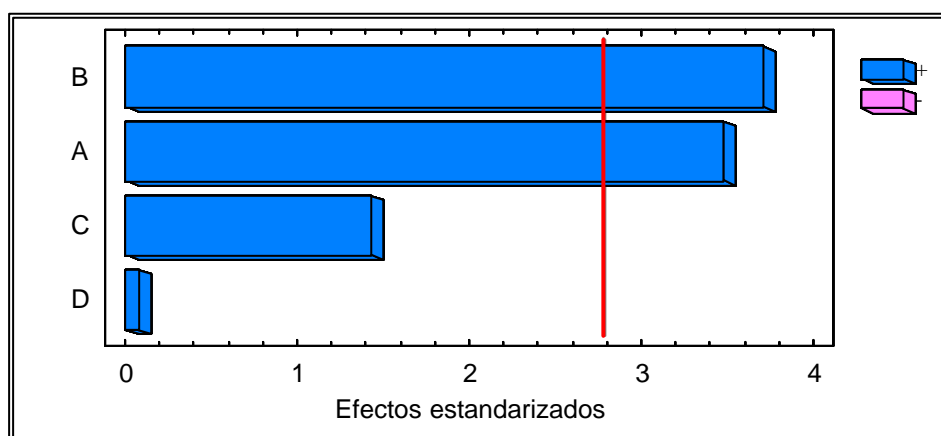


Figura 50.- Lixiviación alcalina del Cr(VI). Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, temperatura de lixiviación; B, tiempo de sonicación; C, caudal de lixiviación; D, volumen de lixivante

El valor de los efectos estimados en las Cartas Pareto para cada una de las variables se indican en la Tabla LIV.

Tabla LIV.- Efectos estimados de cada una de las variables estudiadas

VARIABLE	EFFECTO ESTIMADO
Temperatura de lixiviación	15,45
Tiempo de sonicación	16,45
Caudal de lixiviación	6,3
Volumen de lixivante	0,3

En la Figura 51 se representa mediante líneas la influencia de los efectos principales en la etapa de lixiviación alcalina del filtro de captación de aire para la determinación de Cr(VI). Las líneas indican la magnitud y el signo de la variación de % Eficacia en la Extracción con el nivel del factor (desde el nivel alto hasta el nivel bajo). La pendiente positiva indica que la variación es creciente, es decir, mayor eficacia de extracción en el nivel alto del factor, y en contraposición, la pendiente negativa indica una variación decreciente, mayor eficacia en la extracción en el nivel bajo del factor.

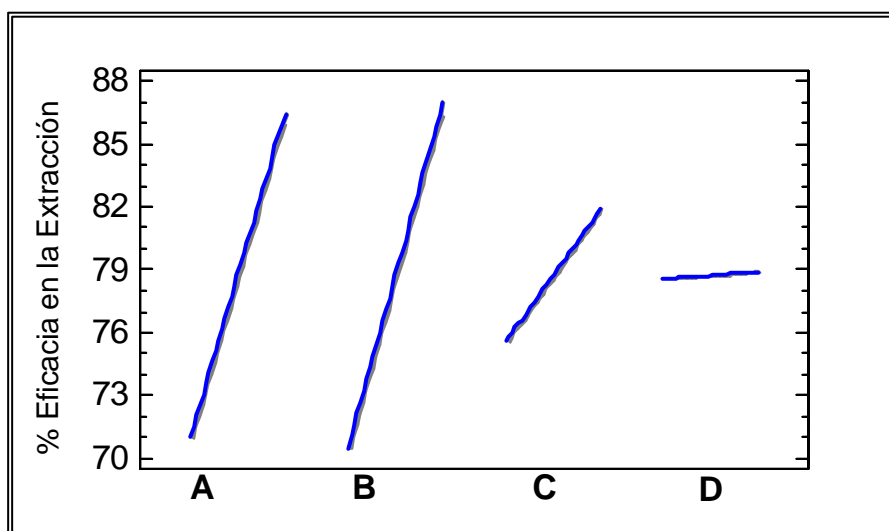


Figura 51.- Lixiviación alcalina del Cr(VI). Representación de los efectos principales de las cuatro variables que afectan al proceso de extracción. A, temperatura de lixiviación; B, tiempo de sonicación; C, caudal de lixiviación; D, volumen de lixivante

### 2.1.1.- Conclusiones del diseño de screening

A partir de las cartas Pareto (Figura 50) y de la representación de los efectos principales (Figura 51) se establecen las siguientes conclusiones:

\* Temperatura de lixiviación: Es una variable estadísticamente significativa con efecto estimado positivo para la lixiviación alcalina del Cr(VI).

\* Tiempo de sonicación: Es una variable estadísticamente significativa con efecto estimado positivo (cuanto más tiempo permanezca la muestra bajo la acción de la energía de ultrasonidos, mayor contacto se produce entre la muestra y la disolución lixivante y por tanto se logra una mayor eficacia en la extracción). Sin embargo, tiempos de sonicación elevados suponen elevados tiempos de análisis y por lo tanto una reducción de la frecuencia de muestreo.

\* Caudal de lixiviación: No es una variable estadísticamente significativa y presenta un efecto estimado positivo, lo que indica que el % de Eficacia en la Extracción de Cr(VI) es directamente proporcional a dicho factor.

\* Volumen de lixivante: No es una variable estadísticamente significativa y presenta un efecto estimado positivo, aunque muy pequeño (0,3), lo que indica que esta variable prácticamente no influye en la extracción de Cr(VI).

Debido a que el diseño factorial de screening no permite la evaluación directa de los términos de interacción entre dos o más factores, se eliminaron del sistema aquellos factores que eran considerados originalmente, pero que no parecían tener influencia sobre el mismo en el intervalo estudiado: caudal de lixiviación y volumen de lixivante. Así, se reevaluó el modelo ahora reducido, pudiéndose considerar las interacciones de segundo orden. La Figura 52 recoge los resultados obtenidos. Como se muestra en esta figura, ninguna interacción de segundo orden es estadísticamente significativa, por lo que se puede variar el valor de una de estas variables sin que se vea afectado el valor de cualquier otra.



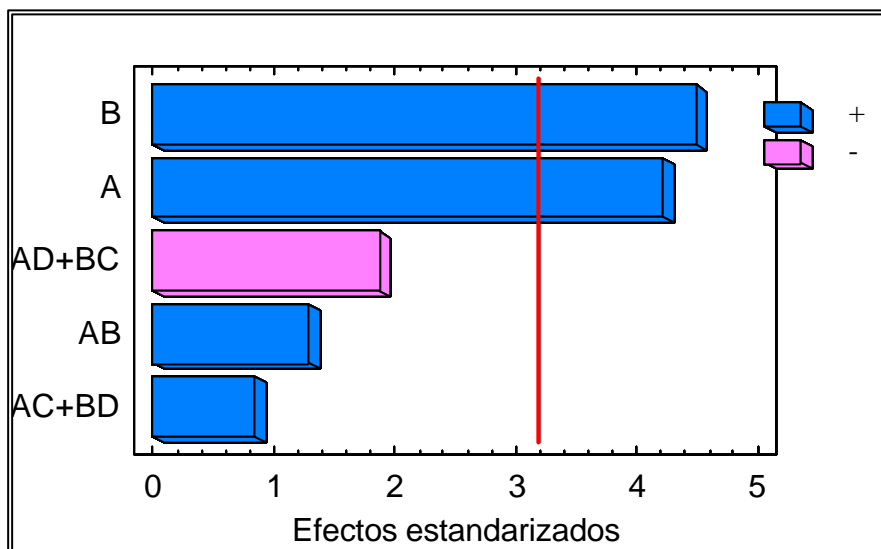


Figura 52.- Lixiviación del Cr(VI). Carta Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, temperatura de lixiviación; B, tiempo de sonicación; C, caudal de lixiviación; D, volumen de lixiviante

Todo lo concluido a partir de la Carta Pareto se corrobora con las gráficas de superficie de respuesta que proporciona el análisis de screening. De esta forma, se demuestra el máximo % de Eficacia en la Extracción se obtiene para el valor máximo estudiado para la temperatura de lixiviación (70 °C) y el valor máximo estudiado para el tiempo de sonicación (5 min) (Figura 53).

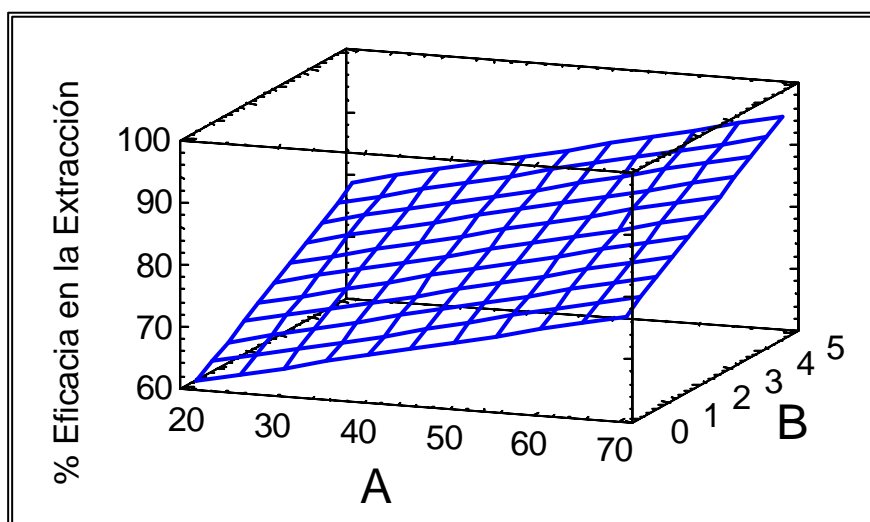


Figura 53.- Superficie de respuesta proporcionadas por el diseño de screening (diseño fracción 1/2): A, temperatura de lixiviación; B, tiempo de sonicación. Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño

Después de haber realizado el análisis de los resultados obtenidos al aplicar el diseño de screening, los valores optimizados para cada una de las variables serían los recogidos en la Tabla LV.

Tabla LV.- Condiciones establecidas para cada variable según el diseño de screening (diseño fracción 1/2)

VARIABLE	VALORES ESTABLECIDOS POR EL DISEÑO
Temperatura de lixiviación (°C)	70
Tiempo de sonicación (min)	5
Caudal de lixiviación (mL/min)	6
Volumen de lixivante (mL)	5

#### 9.2.2. Diseño de Superficie de Respuesta

Como los diseños de screening no proporcionan el valor óptimo de cada una de las variables que determinan el sistema, sino que este tipo de diseños indican las tendencias de cada una de ellas hacia el mismo, se procedió a utilizar un diseño factorial de superficie de respuesta.

Antes de realizar el diseño factorial de superficie de respuesta, se tuvo en cuenta lo siguiente para cada variable:

- Caudal de lixiviación: El diseño de screening establece un efecto estimado positivo para esta variable. Como la utilización de un caudal mayor o menor no implicaría ninguna ventaja en cuanto a características analíticas del método desarrollado, se eligió como valor óptimo un caudal de 6,0 mL/min.
- Volumen de lixivante: El diseño de screening establece para esta variable un efecto estimado positivo, pero bastante pequeño (0,3). Si además se tiene en cuenta que en el experimento n° 1 del diseño de screening (Tabla LIII) se obtiene un % recuperación cuantitativo utilizando un volumen de lixivante de 2 mL (95,5%), se podría tomar

como óptimo este valor y así incrementar la frecuencia de muestreo, ya que habría menos volumen de muestra para pasar por la resina aniónica. Por tanto, éste fue el valor tomado para esta variable.

Así, con el objetivo de afinar el valor óptimo de la temperatura de lixiviación y del tiempo de sonicación, se procedió a realizar un diseño factorial de superficie de respuesta. La Tabla LVI expone los valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta. Los valores máximo y mínimo establecidos para cada variable se han elegido en función de estudios previos y de los resultados obtenidos anteriormente en el diseño de screening.

Tabla LVI.- Valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta

VARIABLE	CLAVE	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
Temperatura de lixiviación	A	40 °C	70 °C
Tiempo de sonicación	B	3 min	5 min

El diseño factorial aplicado de superficie de respuesta es un diseño central composicional  $2^2$  + estrella que implica realizar 10 experimentos (Statgraphics Plus 5.1). Las características del diseño son las siguientes:

- Tipo de Diseño: Superficie de respuesta
- Nombre del Diseño: Central Composicional  $2^2$  + estrella
- Características del diseño: ortogonal
- Número de factores experimentales: 2
- Puntos centrales: 2
- Número de experimentos: 10
- Aleatorio: Si
- Error grados de libertad: 4
- Distancia axial,  $\alpha = 1,07809$

La Tabla LVII muestra la matriz experimental del diseño incluyendo la variable respuesta (% Eficacia en la Extracción) obtenida en cada experimento

por duplicado. Una vez obtenidos los resultados experimentales se introducen en el diseño central composicional para obtener la información necesaria para obtener los valores óptimos de cada variable.

Tabla LVII.- Matriz del diseño central composicional  $2^2 +$  estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del Cr(VI). A, temperatura de lixiviación; B, tiempo de sonicación

Experimento	B	D	% Recuperación
1	55,0	4,0	89,5
2	39,0	4,0	85,9
3	40,0	5,0	97,5
4	70,0	3,0	71,6
5	40,0	3,0	69,7
6	55,0	2,9	71,6
7	71,0	4,0	91,3
8	55,0	4,0	87,9
9	55,0	5,1	96,7
10	70,0	5,0	97,5

### 2.2.1.- Conclusiones del diseño de superficie de respuesta

El análisis de los resultados de la Tabla LVII da lugar a la Carta Pareto que se muestra en las Figura 54. Como se puede observar, sólo el tiempo de sonicación es una variable estadísticamente significativa con un efecto estimado positivo (25,5). Es decir, el % de Eficacia en la Extracción es directamente proporcional al tiempo de sonicación. La temperatura de lixiviación no lo es, y presenta un efecto estimado positivo, aunque bastante pequeño (2,4).

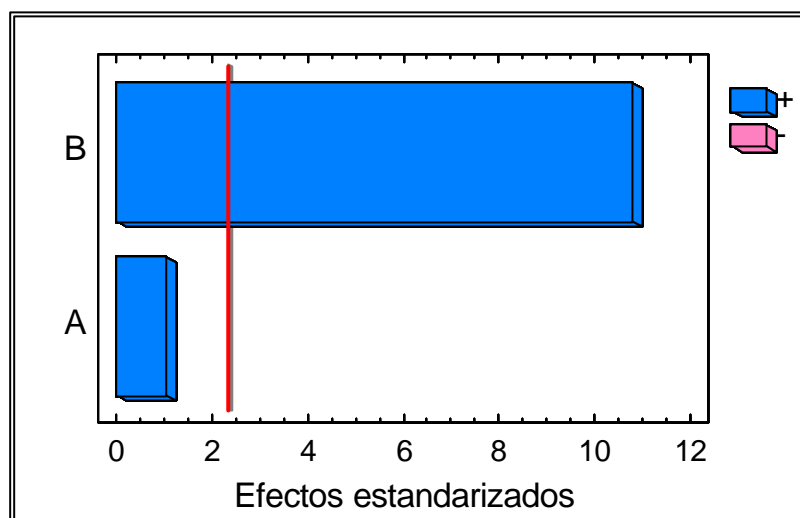


Figura 54.- Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, temperatura de lixiviación; B, tiempo de sonicación

La Figura 55 muestra la superficie de respuesta estimada obtenida por el modelo experimental para las variables estudiadas: A, temperatura de lixiviación; B, tiempo de sonicación.

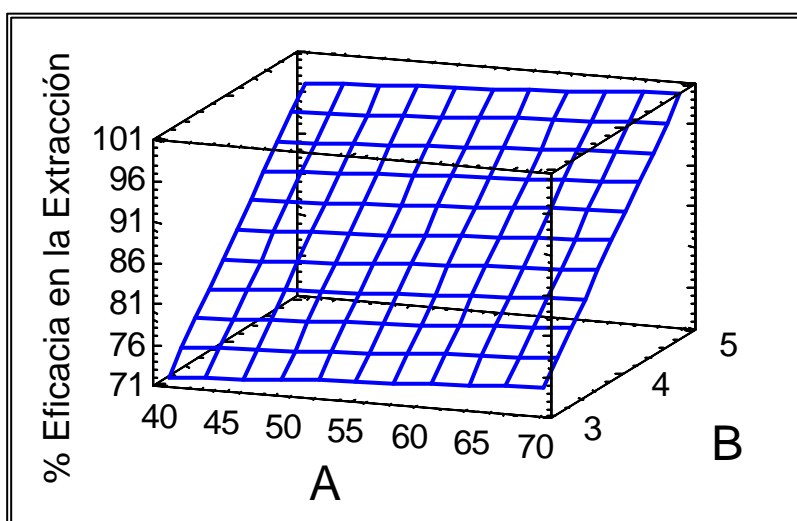


Figura 55.- Superficie de respuesta para el modelo. A, temperatura de lixiviación; B, tiempo de sonicación

A la vista de la superficie de respuesta (Figura 55), se encuentran los valores óptimos de las variables dentro de los intervalos de trabajo que previamente se habían fijado. Estos valores óptimos son:

- A, temperatura de lixiviación: 40 °C. Una temperatura de 20 °C no sería suficiente (según el experimento n° 9 de la Tabla LIII (74,8 % eficacia en la extracción). Sin embargo, si lo serían 40 °C (experimento n° 3, de la Tabla LVII).
- B, tiempo de sonicación: 5 min. Se comprobó que tiempos menores de sonicación a temperaturas de lixiviación mayores de 40 °C daban lugar a % Eficacia en la Extracción no cuantitativos (experimentos n° 1, 4, 6, 7 y 8 de la Tabla LVII).

En resumen, los valores óptimos de las variables implicadas en la lixiviación del cromo hexavalente contenido en el filtro de captación de aire en el Sistema FIA son las que se muestran en la Tabla LVIII.

Tabla LVIII.- Valores óptimos para las variables implicadas en el proceso de lixiviación del Cr(VI) contenido en el filtro de captación de aire en el sistema FIA

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS
Temperatura de lixiviación (°C)	40
Tiempo de sonicación (min)	5
Caudal de lixiviación (mL/min)	6,0
Volumen de lixivante (mL)	2

### 3.- DETERMINACIÓN DE Cr(VI) EN PRESENCIA DE Cr(III)

Con el objetivo de evaluar la posibilidad de realizar la extracción de Cr(VI) en presencia de Cr(III) sin que se produzca variación en el estado de oxidación del cromo, se midieron muestras tomadas en el punto de muestreo III ( $0,49 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Todas las muestras se tomaron al mismo tiempo y en las mismas condiciones: mismo caudal (2,0 L/min), mismo tiempo de muestreo, 100 min (200 L de aire) y mismas características de proceso de soldadura.

El método de determinación de Cr(VI) en humos de soldadura se aplicó utilizando una disolución lixivante (10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -2%  $\text{NaHCO}_3$ ) a la que se le habían adicionado 0,05; 0,15 y 0,20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Cr(III). Como se puede ver en

la Tabla LIX, los % de Recuperación obtenidos están incluidos en el intervalo  $100 \pm 5$  %. Por tanto, se puede concluir que el sistema propuesto no modifica el estado de oxidación del cromo en las muestras de aire.

Tabla LI X.- % Recuperación obtenidos para el Cr(VI) en presencia de Cr (III)

Muestra	Cr(III) $\mu\text{g/mL}$ añadido	% Recuperación
1	0,05	97,1
2	0,15	97,9
3	0,20	98,7

#### 4.- MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE CROMO HEXAVALENTE EN HUMOS DE SOLDADURA

##### 4.1.- Aparatos, Instrumentación Analítica y Reactivos

###### *Aparatos e Instrumentación Analítica*

Ver página 106 y páginas 189-191. Las condiciones de medida para el cromo en el espectrofotómetro de absorción atómica con llama se muestran en la Tabla XXVI (página 154).

###### *Reactivos*

Ver página 107 y páginas 189-191.

##### 4.2.- Procedimiento para la Determinación de Cr(VI) en Humos de Soldadura

El esquema de trabajo del método optimizado para la determinación de Cr(VI) en humos de soldadura se basa en tres etapas:

1) En una primera etapa se realiza la lixiviación del filtro de captación de aire (Figura 56). Para ello se inserta éste con cuidado en la minicolumna una vez enrollado con la ayuda de unas pinzas de plástico. Posteriormente, se colocan dos filtros de papel en los extremos de la columna para evitar pérdidas de partículas sólidas a través del sistema. Una vez preparada la

minicolumna, se conecta en el sistema de flujo continuo, se llena el sistema de disolución lixivante por medio de la VS1 (2 mL de una disolución 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -2%  $\text{NaHCO}_3$ ), manteniendo la temperatura del baño a 40 °C durante todo el proceso. Después, se somete a la minicolumna a la acción de la energía de ultrasonidos durante 5 min a la vez que circula a su través la disolución lixivante. El sentido del movimiento del lixivante que circula a través de la columna a 6 mL/min se cambia cada 30 s para que no se produzcan compactaciones del filtro en la minicolumna.

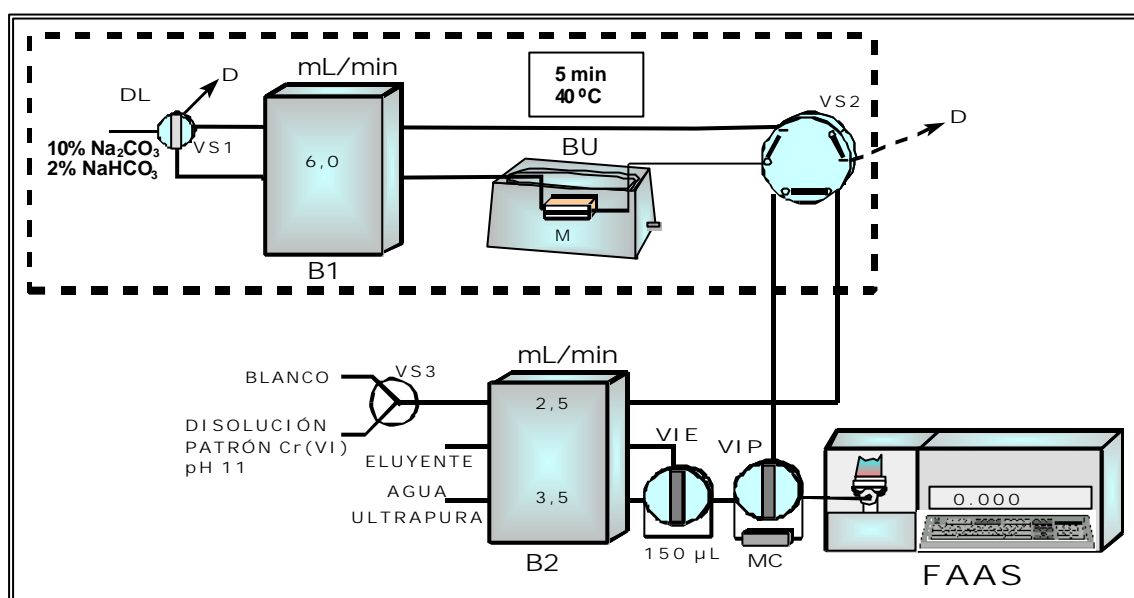


Figura 56.- Sistema FIA Usado para la determinación de Cr(VI) en los filtros de captación de aire. Etapa de lixiviación continua. D, desecho; B1 y B2, bombas peristálticas; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VIE, válvula de inyección de eluyente; VIP, válvula de inyección de preconcentración; MC, minicolumna conteniendo la resina aniónica Dowex 1-X8; DL, disolución lixivante; BU, baño de ultrasonidos; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama

2) Transcurrido el tiempo de lixiviación, se gira la válvula de selección (VS2) de modo que el lixiviado pasa a la parte del sistema FIA que lo conducirá al sistema de preconcentración (Figura 57), mientras que la disolución blanco pasa al desecho y al detector le llega agua ultrapura. Así, el extracto alcalino pasa por la minicolumna a 2,5 mL/min, quedando retenido en la resina el Cr(VI).



3) Una vez que el extracto alcalino haya pasado por la resina, se gira la VIP y la VIE, de manera que se inyecta el eluyente (150  $\mu\text{L}$  de una disolución 0,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,1 M  $\text{NH}_3$ , pH 8,3) sobre un líquido portador (agua ultrapura). Este eluyente pasa por la minicolumna situada en VIP y eluye al Cr(VI) a 3,5 mL/min, siendo después transportado hacia el detector (Espectrofotómetro de absorción atómica con llama).

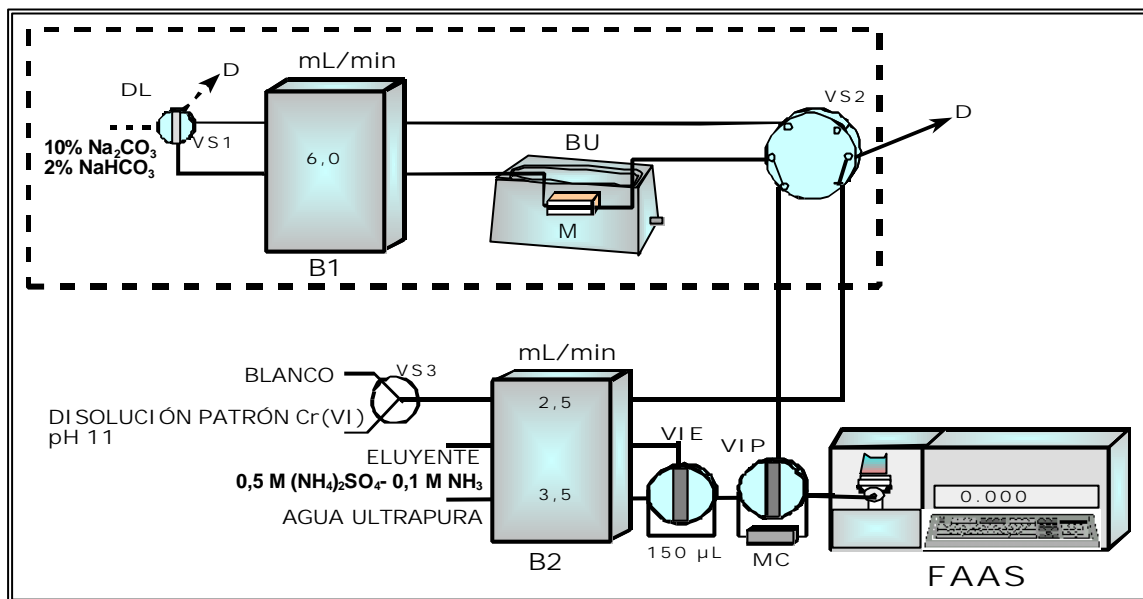


Figura 57.- Sistema FIA Usado para la determinación de Cr(VI) en los filtros de captación de aire. Etapa de preconcentración-elución continua. D, desecho; B1 y B2, bombas peristálticas; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VIE, válvula de inyección de eluyente; VIP, válvula de inyección de preconcentración; MC, minicolumna conteniendo la resina aniónica Dowex 1-X8; DL, disolución lixiviante; BU, baño de ultrasonidos; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama

Para realizar la recta de calibrado se introducen secuencialmente en el sistema FIA disoluciones patrón de distintas concentraciones de Cr(VI) (preparadas en 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -2%  $\text{NaHCO}_3$  (pH 11) (Figura 56). De estas disoluciones patrón se introducen 2 mL en el sistema FIA (durante 48 s a 2,5 mL/min). Después, se gira la VIP y la VIE, de manera que se inyecta el eluyente (150  $\mu\text{L}$  de una disolución 0,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,1 M  $\text{NH}_3$ , pH 8,3) sobre un líquido portador (agua ultrapura). Este eluyente pasa por la minicolumna situada en VIP y eluye al Cr(VI) a 3,5 mL/min, siendo después transportado hacia el detector (Espectrofotómetro de absorción atómica con llama). El blanco es una disolución 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -2%  $\text{NaHCO}_3$  (pH 11).

## 5.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE Cr(VI) EN HUMOS DE SOLDADURA

Se evaluaron las características analíticas del método desarrollado para la determinación de Cr(VI) en humos de soldadura, calculando el factor de preconcentración, los límites de detección y cuantificación, la sensibilidad, el intervalo lineal, la precisión y la exactitud. Además, se estudió el efecto matriz comparando las rectas de calibrado y adición, y se determinó la frecuencia de muestreo.

### 5.1.- Recta de Calibrado. Cálculo del Factor de Preconcentración

Se realizaron dos rectas de calibrado:

- Un calibrado directo que se realizó a través de la medida directa en el espectrofotómetro de absorción atómica con llama de disoluciones patrón de Cr(VI) entre 0-5  $\mu\text{g/mL}$ . La recta de calibrado aparece en la Figura 58A.
- Se realizó un calibrado usando el sistema FIA de preconcentración propuesto con disoluciones patrón de Cr(VI) entre 0-0,37  $\mu\text{g/mL}$ . La recta de calibrado aparece en la Figura 58B.

Estas disoluciones patrón se prepararon en una disolución 0,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,1 M  $\text{NH}_3$ .

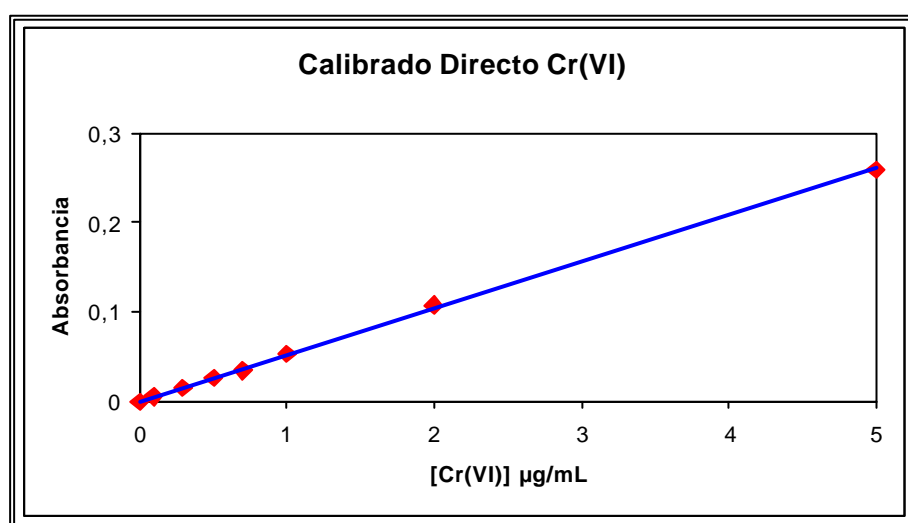


Figura 58A: Calibrado Directo para el Cr(VI):  $A = 0,052(\text{Cr(VI)}, \mu\text{g/mL}) + 4,0 \times 10^{-4}$ ;  $r = 0,9998$

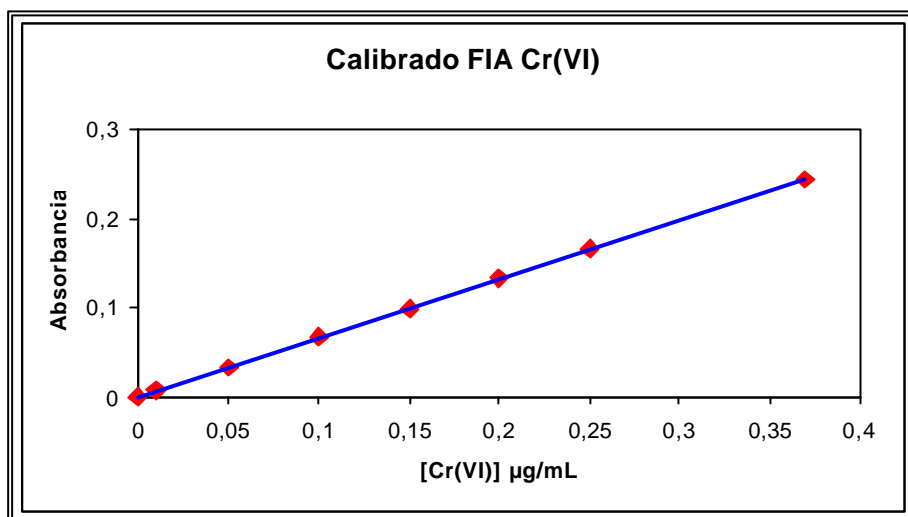


Figura 58B: Calibrado FIA para el Cr(VI):  $A = 0,661(\text{Cr(VI)}, \mu\text{g/mL}) + 1,0 \times 10^{-4}$ ;  $r = 0,9999$

El factor de preconcentración se calcula como el cociente entre la pendiente de la recta de calibrado con preconcentración y la pendiente de la recta de calibrado directa (sin preconcentración). Así, el factor de preconcentración calculado resultó ser de: 12,71.

### 5.2.- Límites de Detección y Límites de Cuantificación

El cálculo del LOD se realizó en base a la determinación de 30 medidas de un blanco (disolución lixiviante, 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -2%  $\text{NaHCO}_3$  (pH 11)) pasada a través de un filtro nuevo, no expuesto, insertado en la columna de extracción), realizadas en las condiciones óptimas. Se calculó el valor de  $3\sigma$  y se substituyó en la recta de calibrado del método para cada metal. En estas condiciones el valor de LOD fue de 1,7  $\mu\text{g/L}$ . Este LOD también se refirió a los distintos volúmenes de aire muestreados a un caudal de 2,0 mL/min (Tabla LX). Para el límite de cuantificación (LOQ) se calculó el valor de  $10\sigma$  y se substituyó en cada recta de calibrado del método. En estas condiciones el valor de LOQ fue de 5,7  $\mu\text{g/L}$ . Este LOQ también se refirió a los distintos volúmenes de aire muestreados a un caudal de 2,0 mL/min (Tabla LX).

Tabla LX.- Límites de detección y cuantificación para la determinación de Cr(VI) en humos de soldadura

		t muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	LOD (µg/m³)
LOD (µg/L)	1,82	100	200	0,018
		150	300	0,012
		t muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	LOQ (µg/m³)
LOQ (µg/L)	6,05	100	200	0,061
		150	300	0,040

### 5.3.- Sensibilidad del Método Analítico

La sensibilidad para el Cr(VI) según la pendiente de la recta de calibrado es de  $661 \mu\text{g}/\text{L}$ . Expresando la sensibilidad del método en función de los volúmenes de aire muestreados se obtienen los resultados en  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Además, se calculó la sensibilidad para un 1% de absorción (absorbancia = 0,0044) que se alcanza con la espectroscopía de absorción atómica con llama ( $6,51 \mu\text{g}/\text{L}$ ). Expresando la sensibilidad para un 1% de absorción en función de los volúmenes de aire muestreados se obtienen los resultados expresados en  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , los cuales se presentan en la Tabla LXI.

### 5.4.-Intervalo Lineal

El intervalo lineal para la determinación del Cr(VI) en humos de soldadura se calculó teniendo en cuenta la ecuación de la recta de calibrado, el límite de cuantificación obtenido, la dispersión del sistema FIA (1,1) y conociendo que en espectroscopía de absorción atómica con llama el límite de linealidad para la determinación directa de cromo es de  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Los intervalos lineales se han expresado en función de los volúmenes de aire muestreados (Tabla LXI).

Tabla LXI.- sensibilidad e intervalo lineal en la determinación de Cr(VI) en humos de soldadura

	t muestreo (min)	V de aire muestreado (L)	
Sensibilidad ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	100	200	6,61
	150	300	4,41
Sensibilidad 1 % absorción ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	100	200	0,065
	150	300	0,043
Intervalo Lineal ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	100	200	0,061-4,33
	150	300	0,040-2,88

#### 5.5.-Estudio de la Precisión del Método

Para evaluar la precisión del método analítico se hizo un estudio de la repetibilidad del proceso global para la determinación de Cr(VI) en humos de soldadura. Con el objetivo de comprobar la precisión de dos concentraciones distintas de Cr(VI), se midieron veintidós muestras reales medidas en dos puntos de muestreo distintos y en las mismas condiciones del proceso de soldadura (once filtros de captación de aire para cada punto de muestreo) que se analizaron con el sistema FIA propuesto, y en las condiciones óptimas. Con los resultados obtenidos se calculó la desviación estándar, la media y el coeficiente de variación. Estos valores se muestran en la Tabla LXII.

Tabla LXII.- Estudio de la precisión en la determinación de Cr(VI) en humos de soldadura

Punto de muestreo III	Volumen de aire muestreado 200 L Tiempo de muestreo 100 min
$\bar{x}$ ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	0,49
$s$ ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	0,01
CV (%)	2,0
Punto de muestreo IV	Volumen de aire muestreado 200 L Tiempo de muestreo 100 min
$\bar{x}$ ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	1,44
$s$ ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	0,02
CV (%)	1,4

### 5.6.- Estudio de la Exactitud del Método

La exactitud de la metodología analítica propuesta se comprobó por comparación con los resultados obtenidos mediante un método de referencia (método establecido por la NIOSH [112]), y mediante el cálculo del porcentaje de recuperación, es decir, analizando muestras reales a las que se les ha añadido una cantidad conocida de Cr(VI).

#### 5.6.1.- Comparación con el método de referencia

Este estudio se aplicó a muestras tomadas en el punto de muestreo IV (200 L de aire tomados a 2,0 L/min). La concentración de Cr(VI) se determinó mediante un método oficial (método establecido por la NIOSH [112]). La concentración así determinada fue de  $1,48 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . También se tomaron otras muestras en el mismo punto de muestreo para determinar su contenido en Cr(VI) por el método propuesto (las muestras para la determinación de Cr(VI) se tomaron al mismo tiempo y en las mismas condiciones: mismo caudal y mismas características de proceso de soldadura). La concentración obtenida por el método propuesto fue de  $1,44 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (n=6).

Con el fin de establecer la exactitud del método propuesto se aplicó el test de comparación de medias (las precisiones de ambos métodos son comparables al 95 % de probabilidad).

a)

Hipótesis nula:	$H_0 : \bar{X}_1 = \bar{X}_2$
Hipótesis alternativa:	$H_1 : \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2$

b) Cálculo del valor de t experimental: 
$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\bar{S} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} = 1,82$$

$$\bar{S} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} = 0,038$$

- c)  $t$  tabulado para  $n_1 + n_2 - 2$  grados de libertad y 95% de probabilidad (test de dos colas):  $t_{\text{tabulado}} = 2,23$
- d) Como  $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabulado}}$  se acepta  $H_0$ , al nivel de significación elegido (95%). Por tanto, los valores medios obtenidos son comparables estadísticamente al nivel de significación elegido, es decir no hay diferencias entre los resultados obtenidos por los dos métodos. Como un grupo de resultados se halló con el método de referencia, se puede decir que el otro (método propuesto) es estadísticamente comparable, y por tanto, exacto.

#### 5.6.2.- Recuperación del método

Para realizar este estudio se llevó a cabo el análisis de muestras tomadas en el punto de muestreo III. El método de determinación de Cr(VI) en humos de soldadura se aplicó utilizando una disolución lixivante (10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -2%  $\text{NaHCO}_3$ ) a la que se le habían adicionado 0,05  $\mu\text{g/mL}$  de Cr(VI). Todas las muestras se tomaron al mismo tiempo y en las mismas condiciones: mismo caudal (2,0 L/min), mismo tiempo 100 min (200 L de aire) y mismas características de proceso de soldadura.

Una vez obtenidos los datos de estos análisis se calculó el % de recuperación de la siguiente forma:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

Siendo:

A: [Cr(VI)] en la muestra + [Cr(VI)] añadida

(valor calculado experimentalmente)

B: [Cr(VI)] en la muestra (valor calculado experimentalmente)

C: [Cr(VI)] añadida

En estas condiciones la recuperación analítica obtenida fue de 97,1%.

Con estos datos se puede decir que el procedimiento utilizado para realizar la determinación de Cr(VI) en humos de soldadura es exacto.

### 5.7.- Recta de Adición

Para realizar este estudio se llevó a cabo el análisis de muestras tomadas en el punto de muestreo III. Las muestras se tomaron en las mismas condiciones: mismo caudal (2,0 L/min), mismo tiempo 100 min (200 L de aire) y mismas características de proceso de soldadura.

El método de determinación de Cr(VI) en humos de soldadura se aplicó utilizando una disolución lixivante (10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -2%  $\text{NaHCO}_3$ ) a la que se le adicionaron distintas concentraciones de Cr(VI) (0-0,1  $\mu\text{g/mL}$ ). Con los resultados de absorbancia obtenidos se trazó la recta de adición (Figura 59).

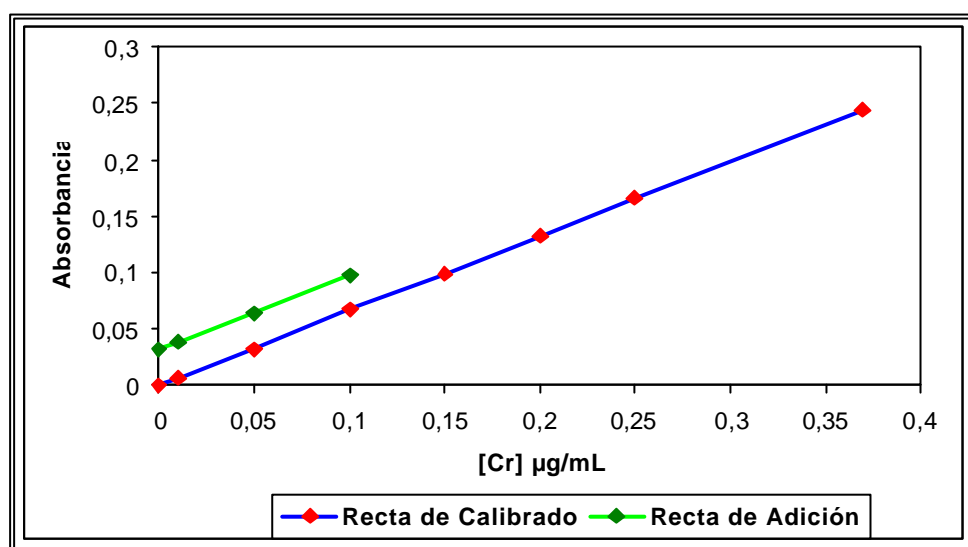


Figura 59.- Cr(VI): Recta de adición.  $A = 0,661 (\text{Cr(VI)}, \mu\text{g/mL}) + 0,032$ ;  $r = 0,998$

En la Figura 59 se observa que ambas rectas, de calibrado y de adición, son totalmente paralelas. Este paralelismo entre ambas rectas, se comprueba estadísticamente (test t, nivel de confianza 95%) mediante el programa ULC (Univariate Linear Calibration) [208]. Por tanto, no tiene lugar ningún efecto matriz. Así, se puede calcular la concentración de Cr(VI) en las muestras utilizando la recta de calibrado.

### 5.8.- Frecuencia de Muestreo

Se calculó la frecuencia de muestreo del método propuesto. Considerando la duración de la etapa de lixiviación, la duración de la etapa de preconcentración (48 s) y la etapa de elución (10 s). De esta manera, la frecuencia de muestreo resulta ser de 10 muestras/h.



## 6.- APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN DE Cr(VI) EN HUMOS DE SOLDADURA

Se establecieron tres puntos de muestreo estáticos (ambientales) y un punto de muestreo personal. Los puntos de muestreo estáticos se establecieron a 2, 1 y 0,5 m desde la zona donde se realiza la operación de soldadura (puntos de muestreo I, II y III, respectivamente) y colocando al trabajador el aparato de muestreo, de manera que la zona de captación de aire, es decir el filtro, estuviera cerca de su nariz (punto de muestreo IV). La captación de aire se realizó a un caudal de 2,0 L/min mientras se estaba produciendo la operación de soldadura. Las muestras se tomaron por triplicado al mismo tiempo en cada uno de los puntos de muestreo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla LXIII.

Tabla LXIII.- Concentración de Cr(VI) en humos de soldadura

Puesto de trabajo muestreado: Puesto 1 Soldador. Empresa con actividad construcción metálica y calderería			
Punto de muestreo	Tiempo de muestreo (min)	Volumen de aire muestreado (L)	[Cr(VI)] media $\pm$ desviación estándar, (n=3) ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
I	100	200	0,11 $\pm$ 0,00
II	100	200	0,24 $\pm$ 0,01
III	100	200	0,49 $\pm$ 0,01
IV	100	200	1,44 $\pm$ 0,02
Puesto de trabajo muestreado: Puesto 2 Soldador. Empresa con actividad construcción naval			
I	100	200	N.D. <sup>1</sup>
II	100	200	N.D. <sup>1</sup>
III	100	200	0,10 $\pm$ 0,00
IV	100	200	0,26 $\pm$ 0,01

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

En la Tabla LXIII se muestran los resultados obtenidos para cada una de las muestras de aire analizadas en los dos puestos de trabajo muestreados. En ambos casos en el punto de muestreo IV (cerca de la nariz del soldador) es

donde se localizan las concentraciones más altas de Cr(VI). Por el contrario, en el punto de muestreo I situado a 2 m de donde se realiza la operación de soldadura, la concentración Cr(VI) es la más baja. En todos los casos, la concentración Cr(VI) es mayor en el puesto de trabajo 1. Además, en ninguno de los casos se supera el VLA-ED establecido para los compuestos solubles e insolubles de Cr(VI) ( $50$  y  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , respectivamente), Tabla IV, p. 24 [27].

En las Figuras 60 A y B se muestra la relación entre el Cr(III) y el Cr(VI) en los humos de soldadura (considerando las concentraciones totales de cromo encontradas, Tabla XLI (3), p. 180, y calculando la concentración de Cr(III) por diferencia). La concentración de Cr(VI) en los humos de soldadura corresponde a un valor entre 1,1 - 1,6 % del cromo total.

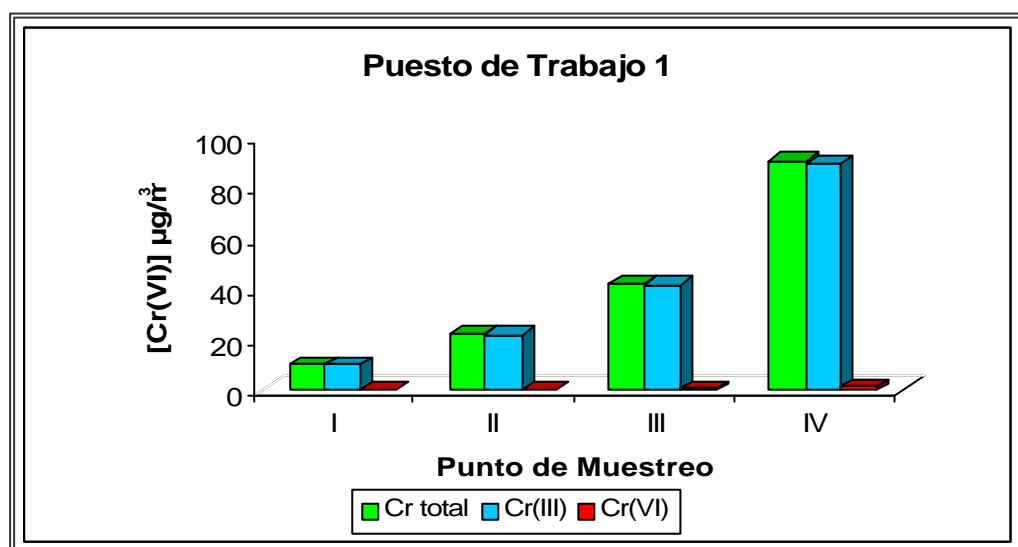


Figura 60 A.- Cromo en humos de soldadura: Puesto de trabajo 1

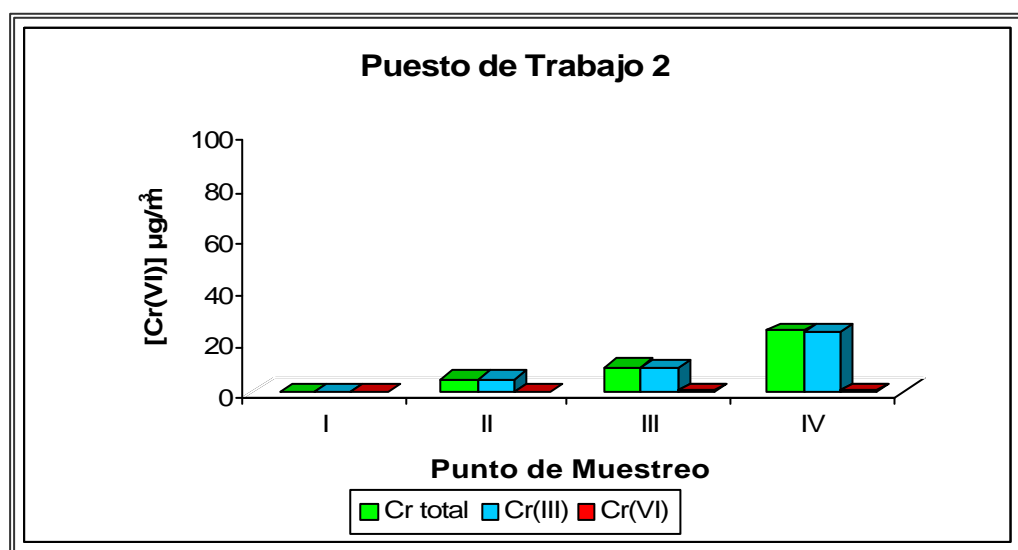


Figura 60 B.- Cromo en humos de soldadura: Puesto de trabajo 2



**Capítulo V.-**  
***Parte Experimental 3:***  
***Determinación de Metales en Pelo***



## 1.- MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE PELO

Las muestras de pelo se tomaron de trabajadores expuestos a humos de soldadura de personas no expuestas (muestras control). Se cortaron con tijeras de acero inoxidable unos 2-3 mechones de cabello de la base de la nuca (de 5 a 10 hebras de pelo cada uno) de 1 a 3 cm de longitud (ver recomendaciones del proceso de muestreo de pelo en la página 62). Una vez realizada la toma, las muestras se colocaron en frascos secos de polietileno (lavados previamente con una disolución de ácido nítrico 10%(V/V) durante 48 horas y enjuagados después con agua ultrapura).

La eliminación de los contaminantes exógenos se realizó por el método de la IAEA [118]: lavado secuencial del pelo con acetona, agua desionizada (tres veces) y acetona. Entre cada lavado se cubre el pelo completamente con cada disolución de lavado durante 10 min a temperatura ambiente y con agitación constante. Después, se decanta el líquido y se deja secar el pelo en una estufa a 100 °C durante aproximadamente 15 min. Por último, las muestras se cortan en segmentos más pequeños.

## 2.- DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA CONTINUO DE LIXIVIACIÓN ASISTIDA POR ENERGÍA DE ULTRASONIDOS

Este estudio se ha enfocado en la extracción y determinación de cadmio, cinc, cobalto, cobre, cromo, hierro, manganeso, níquel y plomo en pelo de trabajadores expuestos a humos de soldadura, en los que en teoría la concentración de estos metales es mayor que en las muestras control. Para ello se ha utilizado un dispositivo FIA en el que se pueden distinguir dos etapas fundamentales:

- Lixiviación continua de la muestra de pelo en una columna de pequeñas dimensiones.
- Conducción del lixiviado obtenido al sistema de detección (FAAS) mediante un líquido portador.

El sistema FIA empleado para la lixiviación de la muestra de pelo y posterior detección de los metales presentes en la misma es el mismo que el utilizado para la determinación de metales en humos de soldadura (Figuras 26 y 27, p. 105).

## 2.1.- Aparatos, Instrumentación Analítica y Reactivos

### *Aparatos e Instrumentación Analítica*

Ver página 106.

En este caso, la muestra de pelo (del orden de los mg) es la que se sitúa dentro de la minicolumna. Así, antes de introducir la muestra en la columna se crea un “lecho” con lana de vidrio que facilite el paso de disolución extractante a través de la misma y evite que la muestra se compacte, dando lugar a que se produzca presión en el sistema FIA. Además, tal y como se indica en la Figura 61, se coloca en cada extremo de la columna un papel de filtro (Whatman 541) para evitar la salida de la muestra de la minicolumna e impedir cualquier obturación en el sistema continuo de extracción.

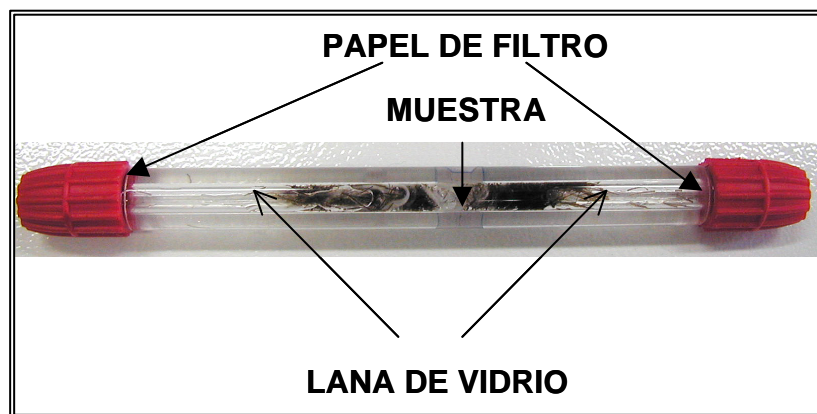


Figura 61. Fotografía de la columna donde se introduce la muestra de pelo

### *Reactivos*

Ver página 107.

### 3.- OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA LIXIVIACIÓN DE LOS METALES DE LA MUESTRA DE PELO EN EL SISTEMA FIA: DISEÑOS EXPERIMENTALES

#### 3.1. Diseños de Screening

Las variables implicadas en el proceso de extracción realizado con un dispositivo FIA como el reflejado en la Figura 26 que se optimizaron fueron siete:

- ❖ Concentración de  $\text{HNO}_3$
- ❖ Concentración de  $\text{HCl}$
- ❖ Tiempo de sonicación
- ❖ Temperatura de lixiviación
- ❖ Caudal de lixiviación
- ❖ Volumen de lixivante
- ❖ Tamaño de partícula

Siendo el ácido nítrico y el clorhídrico la disolución lixivante.

Los valores máximos y mínimos para estas variables fueron seleccionados en función de experimentos realizados en estudios previos (Tabla LXIV).

Tabla LXIV.- Variables y niveles considerados para el diseño factorial de screening

VARIABLE	CLAVE	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
$[\text{HNO}_3]$	A	0 M	3M
$[\text{HCl}]$	B	0 M	3 M
Tiempo de sonicación	C	0,5 min	5 min
Temperatura de lixiviación	D	20 °C	70 °C
Caudal de lixiviación	E	3 mL/min	6 mL/min
Volumen de lixivante	F	2 mL	5 mL
Tamaño de partícula	G	0,5 cm	1 cm

El diseño factorial aplicado es el de Plackett-Burman  $2^{7*3/32}$  que implica realizar 13 experimentos que fueron aleatorizados para evitar errores de sistema (Statgraphics Plus v.5.1). En este diseño se ha considerado un punto central en el que las variables toman un valor medio entre el límite superior e inferior.

- Tipo de Diseño: Screening
- Nombre del Diseño: Plackett-Burman ( $2^{7*3/32}$ )
- Número de factores experimentales: 7
- Número de respuestas: 1
- Número de experimentos: 13
- Puntos centrales: 1
- Error grados de libertad: 5
- Aleatorio: Si

Una vez obtenida la matriz, se realizaron los experimentos fijados por la misma. Para realizar estos experimentos para los diferentes metales, se utilizó una muestra de pelo (de un trabajador expuesto a humos de soldadura) en la que se determinó previamente la concentración de los metales por el método de referencia (basado en una digestión ácida convencional utilizando ácidos concentrados). La cantidad de muestra analizada por el método de referencia se escogió en función de la concentración del metal presente en la misma y del intervalo lineal del mismo en el detector (FAAS). La digestión ácida en el método de referencia se realizó con ácido nítrico concentrado en un recipiente abierto y calentando en una placa calefactora. Una vez que la muestra está completamente digerida, se deja enfriar, y después se diluye con agua ultrapura hasta 10 mL en un matraz aforado. La determinación de cada metal se realizó por FAAS. Las concentraciones así determinadas son las que aparecen en la Tabla LXV.



Tabla LXV.- Concentración de los metales en una muestra de pelo obtenidas por el método de referencia

	Cantidad de muestra analizada (g)	Concentración media $\pm$ desviación estándar, $\mu\text{g/g}$ (n=6)	CV <sup>1</sup> (%)
Cd	0,3	3,4 $\pm$ 0,2	5,9
Co	1,0	4,0 $\pm$ 0,2	5,0
Cr	0,3	9,5 $\pm$ 0,3	3,2
Cu	0,3	77,7 $\pm$ 1,0	1,3
Fe	0,3	96,4 $\pm$ 1,3	1,4
Mn	0,3	11,1 $\pm$ 0,3	2,7
Ni	1,0	4,1 $\pm$ 0,2	4,9
Pb	0,3	55,3 $\pm$ 1,0	1,8
Zn	0,05	190,6 $\pm$ 2,0	1,1

<sup>1</sup>CV (coeficiente de variación)

La variable respuesta (% Eficacia en la Extracción) se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Eficacia en la extracción} = \frac{[\text{Metal}] \text{ determinada por el método propuesto}}{[\text{Metal}] \text{ determinada por el método de referencia}} \times 100$$

Se tomaron 100 mg de muestra para todos los casos excepto para Fe (50 mg) y para Zn (10 mg), ya que para estos metales la concentración encontrada es muy elevada y se superaría el límite de linealidad del detector si se utilizaran 100 mg de muestra. Por otro lado, para el Co y el Ni, como la concentración en la muestra es bastante pequeña, y quedarían disoluciones demasiado diluidas en el caso de realizar la extracción con 5 mL de disolución lixivante, se adicionó a la disolución lixivante 1  $\mu\text{g/mL}$  de estos metales.

Los % de Eficacia en la Extracción obtenidos por triplicado y expresados como la media de los dos valores calculados obtenidos para cada experimento del diseño se muestran en las Tablas LXVI (1-9).

Tabla LXVI (1).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^{7*3/32}$  para las siete variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del cadmio*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Eficacia en la Extracción
1	3	0	5	70	3	5	0,5	97,1
2	1,5	1,5	2,75	45	4,5	3,5	0,75	64,7
3	3	3	0,5	70	6	2	1	70,6
4	3	3	5	20	6	5	0,5	61,8
5	0	0	5	70	6	2	1	17,6
6	0	3	5	20	6	2	0,5	28,6
7	3	0	5	20	3	2	1	50
8	0	0	0,5	70	6	5	0,5	0
9	0	3	0,5	20	3	5	1	0
10	3	3	0,5	70	3	2	0,5	76,5
11	0	0	0,5	20	3	2	0,5	0
12	0	3	5	70	3	5	1	64,7
13	3	0	0,5	20	6	5	1	35,3

Tabla LXVI (2).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^{7*3/32}$  para las siete variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del cobalto*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Eficacia en la Extracción
1	1,5	1,5	2,75	45	4,5	3,5	0,75	53,2
2	3	3	0,5	70	3	2	0,5	63,5
3	3	3	0,5	70	6	2	1	63,5
4	0	3	5	70	3	5	1	65,0
5	0	3	0,5	20	3	5	1	0
6	3	0	0,5	20	6	5	1	0
7	0	0	5	70	6	2	1	0
8	0	0	0,5	70	6	5	0,5	0
9	3	0	5	20	3	2	1	37,4
10	3	3	5	20	6	5	0,5	54,4
11	0	0	0,5	20	3	2	0,5	0
12	0	3	5	20	6	2	0,5	22,8
13	3	0	5	70	3	5	0,5	98,7

Tabla LXVI (3).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^7 \cdot 3/32$  para las siete variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del cromo*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Eficacia en la Extracción
1	3	3	0,5	70	3	2	0,5	68,4
2	3	0	5	70	3	5	0,5	92,6
3	3	3	0,5	70	6	2	1	51,6
4	3	3	5	20	6	5	0,5	62,1
5	1,5	1,5	2,75	45	4,5	3,5	0,75	47,4
6	0	0	5	70	6	2	1	0
7	3	0	5	20	3	2	1	28,4
8	0	0	0,5	70	6	5	0,5	0
9	3	0	0,5	20	6	5	1	15,8
10	0	3	5	70	3	5	1	51,6
11	0	0	0,5	20	3	2	0,5	0
12	0	3	5	20	6	2	0,5	30,5
13	0	3	0,5	20	3	5	1	0

Tabla LXVI (4).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^7 \cdot 3/32$  para las siete variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del cobre*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Eficacia en la Extracción
1	3	0	5	20	3	2	1	49,9
2	0	0	0,5	20	3	2	0,5	0
3	3	3	0,5	70	6	2	1	71,4
4	3	3	0,5	70	3	2	0,5	74,7
5	0	0	5	70	6	2	1	10,7
6	3	0	0,5	20	6	5	1	30,8
7	3	0	5	70	3	5	0,5	99,5
8	0	0	0,5	70	6	5	0,5	0
9	0	3	5	70	3	5	1	61,4
10	3	3	5	20	6	5	0,5	60,1
11	1,5	1,5	2,75	45	4,5	3,5	0,75	57,4
12	0	3	5	20	6	2	0,5	35,7
13	0	3	0,5	20	3	5	1	9,1

Tabla LXVI (5).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^7 \times 3/32$  para las siete variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del hierro*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Eficacia en la Extracción
1	3	3	0,5	70	6	2	1	68,7
2	0	3	5	70	3	5	1	75,2
3	3	0	5	70	3	5	0,5	100,7
4	0	3	0,5	20	3	5	1	7,7
5	0	0	5	70	6	2	1	15,5
6	3	0	5	20	3	2	1	52,7
7	0	0	0,5	20	3	2	0,5	0
8	0	0	0,5	70	6	5	0,5	0
9	1,5	1,5	2,75	45	4,5	3,5	0,75	61,3
10	3	3	5	20	6	5	0,5	59,8
11	3	3	0,5	70	3	2	0,5	81,3
12	0	3	5	20	6	2	0,5	42,9
13	3	0	0,5	20	6	5	1	32,7

Tabla LXVI (6).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^7 \times 3/32$  para las siete variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del manganeso*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Eficacia en la Extracción
1	0	3	5	70	3	5	1	62,4
2	0	0	5	70	6	2	1	42,6
3	3	3	0,5	70	6	2	1	71,6
4	0	3	5	20	6	2	0,5	38,5
5	3	0	5	70	3	5	0,5	100,2
6	3	0	5	20	3	2	1	52,4
7	3	3	5	20	6	5	0,5	71,6
8	0	3	0,5	20	3	5	1	0
9	0	0	0,5	70	6	5	0,5	0
10	3	0	0,5	20	6	5	1	49,8
11	0	0	0,5	20	3	2	0,5	0
12	3	3	0,5	70	3	2	0,5	74,4
13	1,5	1,5	2,75	45	4,5	3,5	0,75	59,8

Tabla LXVI (7).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^7 \cdot 3/32$  para las siete variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del níquel*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Eficacia en la Extracción
1	0	3	5	20	6	2	0,5	25,6
2	0	0	0,5	20	3	2	0,5	0
3	0	3	0,5	20	3	5	1	0
4	0	3	5	70	3	5	1	77,5
5	3	3	0,5	70	6	2	1	61,3
6	3	0	0,5	20	6	5	1	0
7	3	0	5	20	3	2	1	41,0
8	0	0	0,5	70	6	5	0,5	0
9	3	0	5	70	3	5	0,5	102,6
10	3	3	5	20	6	5	0,5	61,3
11	0	0	5	70	6	2	1	0
12	1,5	1,5	2,75	45	4,5	3,5	0,75	43,6
13	3	3	0,5	70	3	2	0,5	61,3

Tabla LXVI (8).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^7 \cdot 3/32$  para las siete variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del plomo*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Eficacia en la Extracción
1	0	3	5	70	3	5	1	71,3
2	3	0	5	20	3	2	1	37,0
3	3	3	0,5	70	6	2	1	61,1
4	3	0	5	70	3	5	0,5	102,5
5	3	3	0,5	70	3	2	0,5	61,1
6	3	3	5	20	6	5	0,5	55,0
7	3	0	0,5	20	6	5	1	13,5
8	0	0	0,5	70	6	5	0,5	0
9	0	3	0,5	20	3	5	1	0
10	1,5	1,5	2,75	45	4,5	3,5	0,75	50,2
11	0	0	0,5	20	3	2	0,5	0
12	0	3	5	20	6	2	0,5	27,0
13	0	0	5	70	6	2	1	0

Tabla LXVI (9).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^7 \cdot 3/32$  para las siete variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la *lixiviación del cinc*

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Eficacia en la Extracción
1	0	3	5	70	3	5	1	67,7
2	3	0	0,5	20	6	5	1	32,8
3	3	3	0,5	70	6	2	1	97,7
4	1,5	1,5	2,75	45	4,5	3,5	0,75	89,9
5	0	0	0,5	70	6	5	0,5	18,5
6	0	0	5	70	6	2	1	19,7
7	0	0	0,5	20	3	2	0,5	0
8	3	0	5	70	3	5	0,5	101,0
9	0	3	0,5	20	3	5	1	30,6
10	3	3	5	20	6	5	0,5	46,7
11	3	3	0,5	70	3	2	0,5	97,7
12	0	3	5	20	6	2	0,5	41,9
13	3	0	5	20	3	2	1	39,9

Para conocer qué variables son significativas, es decir aquellas que van a tener una gran influencia sobre el % Eficacia en la Extracción de los metales, se recurre a la Carta Pareto estandarizada (Figuras 62 (I-IX)).

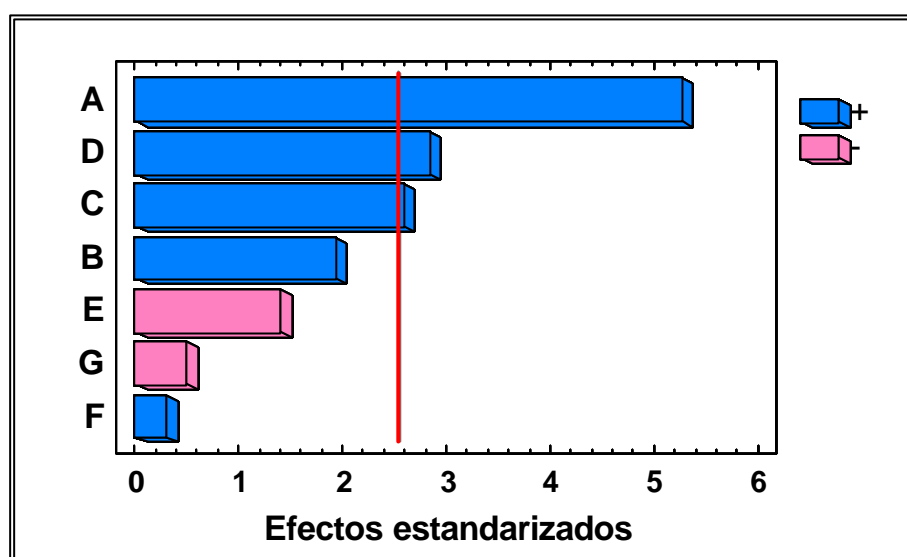


Figura 62(I).- Lixiviación del cadmio. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante; G, tamaño de partícula

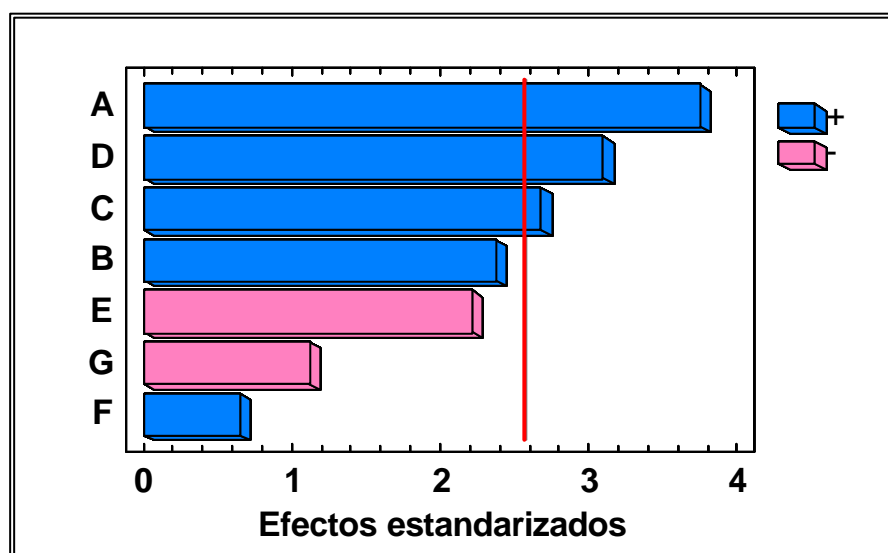


Figura 62 (II).- Lixiviación del cobalto. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante; G, tamaño de partícula

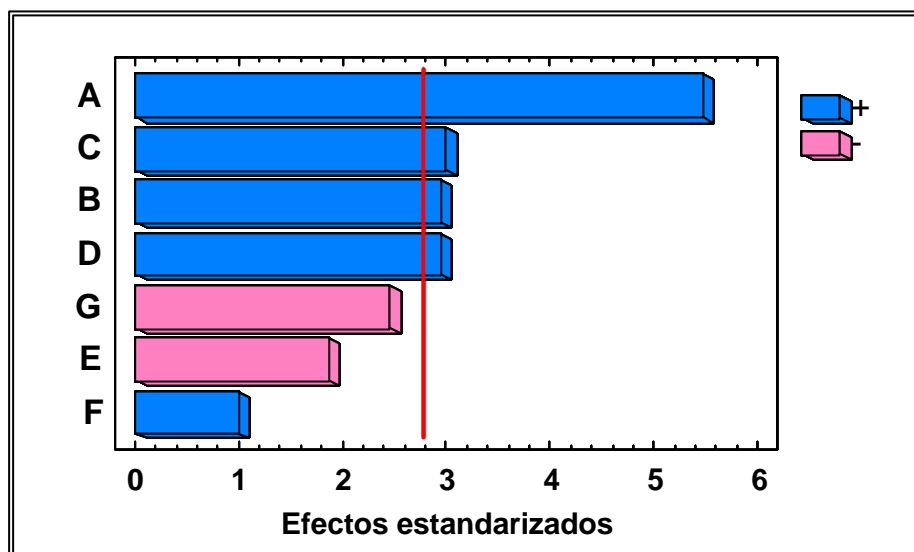


Figura 62(III).- Lixiviación del cromo. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $\text{[HNO}_3\text{]}$ ; B,  $\text{[HCl]}$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante; G, tamaño de partícula

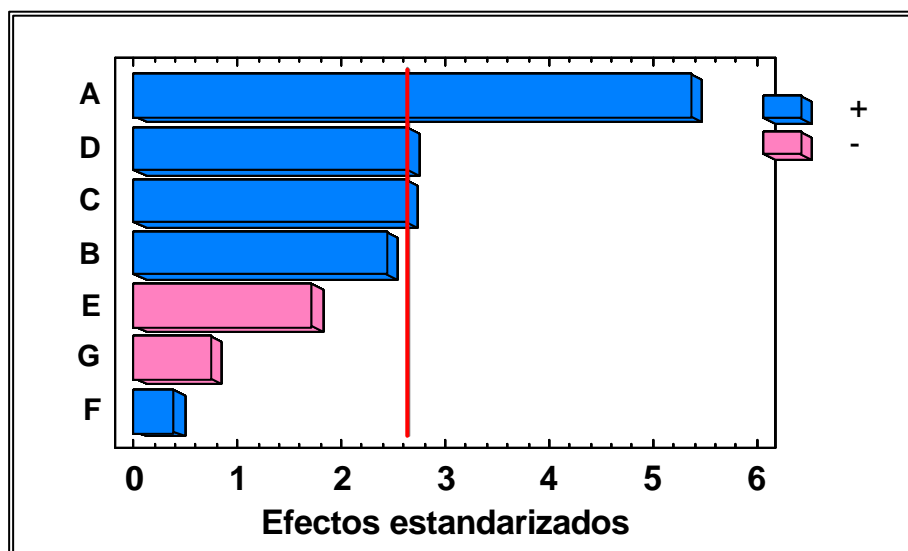


Figura 62(IV).- Lixiviación del cobre. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $\text{[HNO}_3\text{]}$ ; B,  $\text{[HCl]}$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante; G, tamaño de partícula



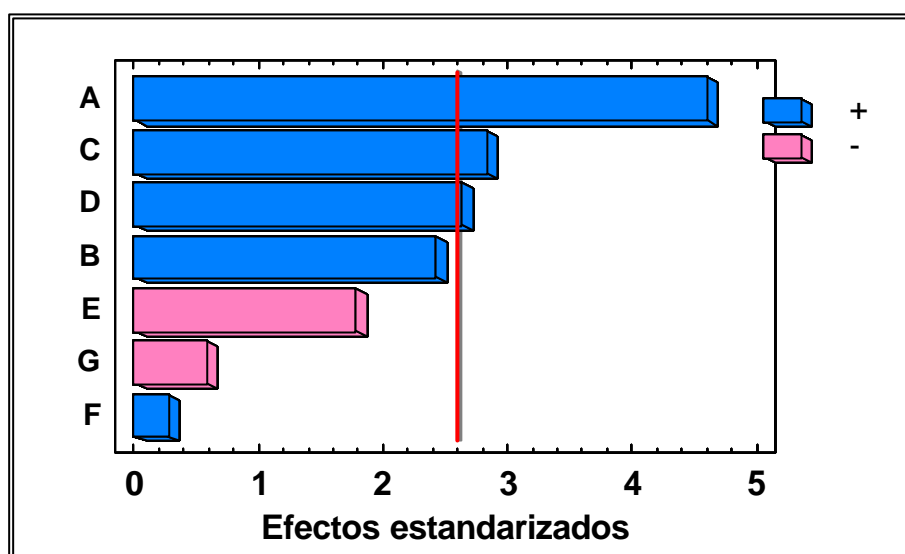


Figura 62(V).- Lixiviación del hierro. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante; G, tamaño de partícula

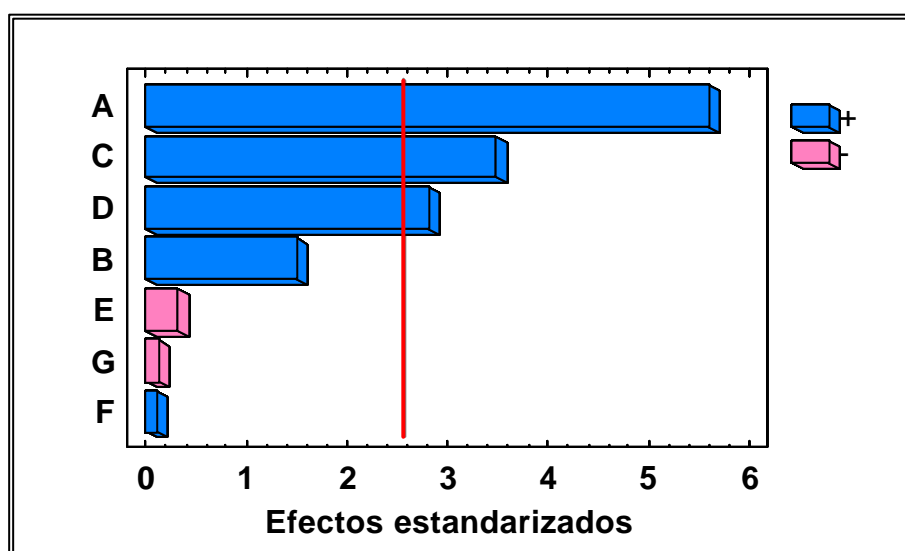


Figura 62(VI).- Lixiviación del manganeso. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante; G, tamaño de partícula

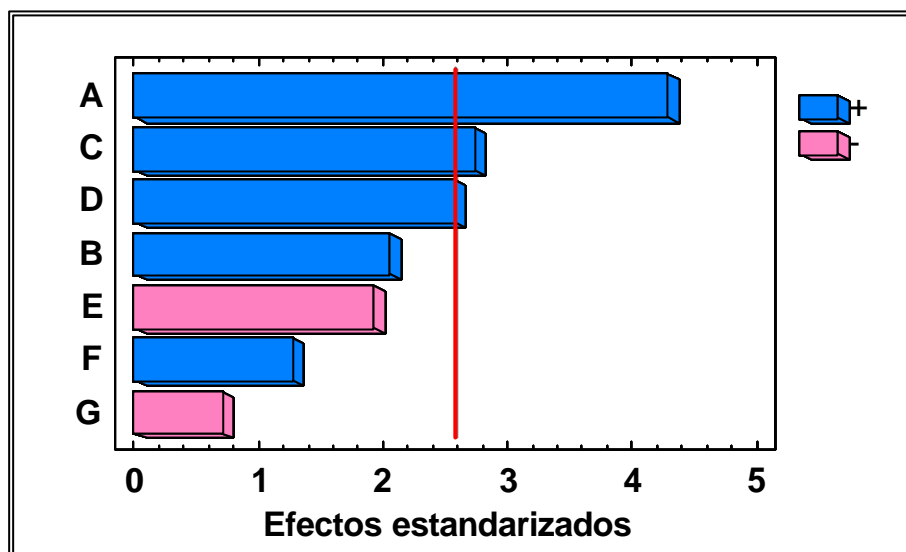


Figura 62(VII).- Lixiviación del níquel. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante; G, tamaño de partícula

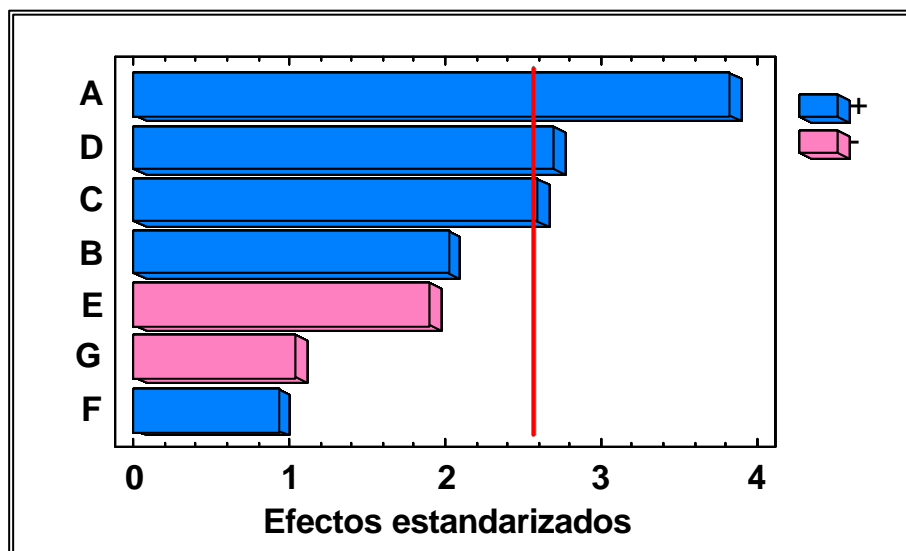
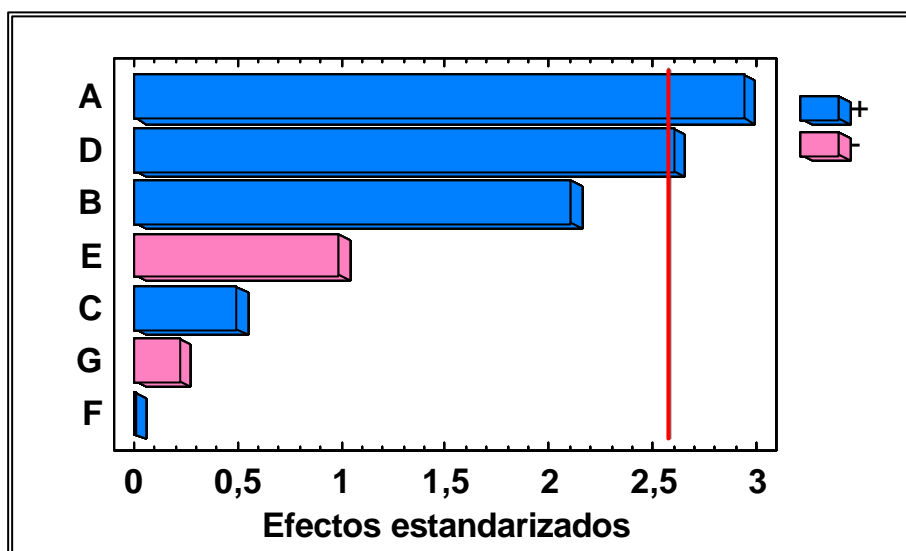


Figura 62(VIII).- Lixiviación del plomo. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante; G, tamaño de partícula



62(IX).- Lixiviación del cinc. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [HNO<sub>3</sub>]; B, [HCl]; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante; G, tamaño de partícula

El valor de los efectos estimados en las Cartas Pareto para cada una de las variables se indican en la Tabla LXVII.

Tabla LXVII.- Efectos estimados de cada una de las variables estudiadas

VARIABLE	EFECTO ESTIMADO									
	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn	
[HNO <sub>3</sub> ]	46,7	37,1	39,5	44,9	42,4	46,1	41,5	38,7	39,6	
[HCl]	17,0	19,4	21,2	20,3	22,3	12,3	19,9	20,4	28,4	
Tiempo de sonicación	22,9	26,5	31,6	21,9	26,1	28,7	26,4	26,2	6,6	
Temperatura de lixiviación	25,1	30,6	21,2	22,0	24,3	23,2	24,9	27,3	35,1	
Caudal de lixiviación	-12,4	-11,9	-13,5	-14,3	-16,3	-2,6	-18,6	-19,2	-13,3	
Volumen de lixivante	2,6	6,4	7,2	3,1	2,5	0,8	12,3	9,4	0,1	
Tamaño de partícula	-4,3	-11,0	-15,1	-6,1	-5,4	-1,0	-6,9	-10,5	-2,9	

En las Figuras 63(I-IX) se representa mediante líneas la influencia de los efectos principales en la etapa de lixiviación de los metales de la muestra de pelo.

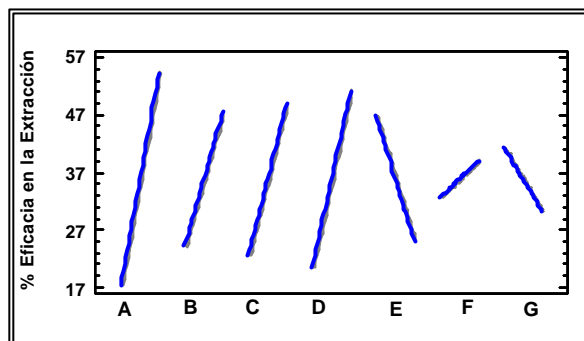
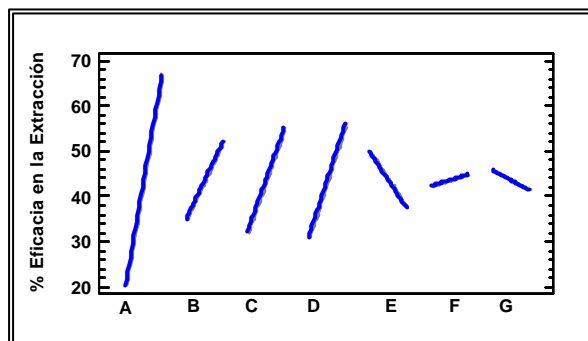


Fig. 63(I).-Lixiviación del cadmio Fig.63(II).- Lixiviación del cobalto  
Representación de los efectos principales de las siete variables que afectan al proceso de extracción. A,  $\text{HNO}_3$ ; B,  $\text{HCl}$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante; G, tamaño de partícula

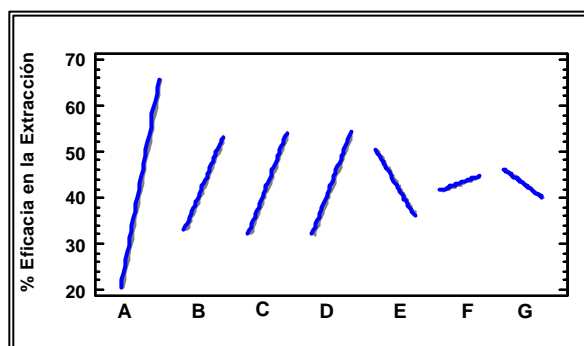
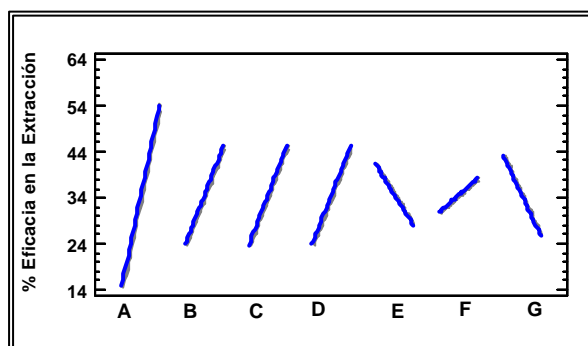


Fig. 63(III).- Lixiviación del cromo Fig. 63(IV).- Lixiviación del cobre  
Representación de los efectos principales de las siete variables que afectan al proceso de extracción. A,  $\text{HNO}_3$ ; B,  $\text{HCl}$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante; G, tamaño de partícula

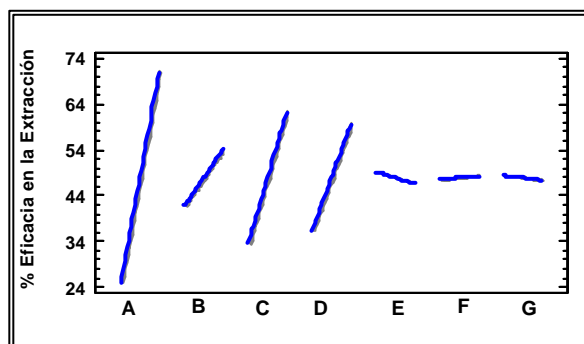
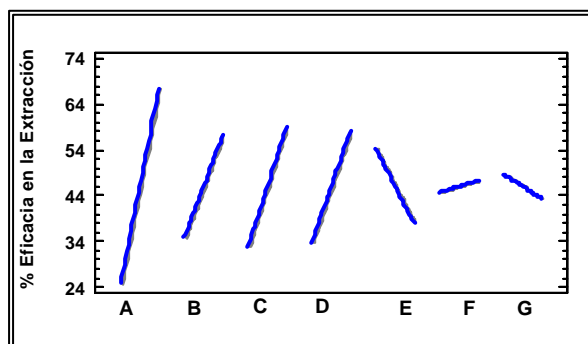


Fig. 63(V).- Lixiviación del hierro Fig.63(VI).-Lixiviación del manganeso  
Representación de los efectos principales de las siete variables que afectan al proceso de extracción. A,  $\text{HNO}_3$ ; B,  $\text{HCl}$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante; G, tamaño de partícula

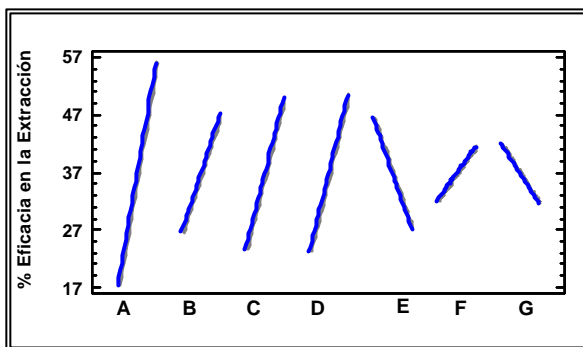
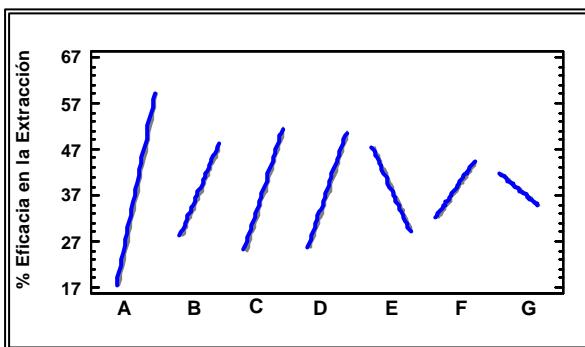


Fig. 63(VII).- Lixiviación del níquel Fig. 63(VIII).- Lixiviación del plomo  
Representación de los efectos principales de las siete variables que afectan al proceso de extracción. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante; G, tamaño de partícula

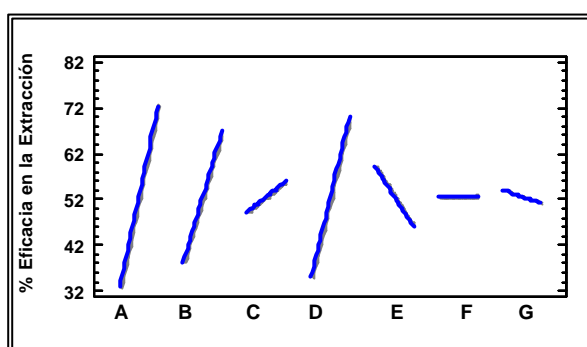


Figura 63(IX).- Lixiviación del Cinc.

Representación de los efectos principales de las siete variables que afectan al proceso de extracción. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante; G, tamaño de partícula

### 3.1.1. Conclusiones del diseño de screening (Plackett-Burman)

A partir de las cartas Pareto (Figuras 62 (I-IX)) y de la representación de los efectos principales (Figuras 63 (I-IX)) se establecen las siguientes conclusiones.

En función de cada metal:

\* Cadmio: La concentración de  $\text{HNO}_3$ , el tiempo de sonicación y la temperatura de lixiviación son las variables estadísticamente significativas para extraer el cadmio de la muestra de pelo. Así, se observa que cuanto mayor es su valor mayor es el % de Extracción de cadmio. Las demás variables presentan efectos estimados positivos (concentración de  $\text{HCl}$  y volumen de lixivante) y negativos (caudal de lixiviación y tamaño de

partícula), pero sin superar el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 62(I)).

\* Cobalto: La concentración de  $\text{HNO}_3$ , el tiempo de sonicación y la temperatura de lixiviación son las variables estadísticamente significativas para extraer el cobalto de la muestra de pelo. Así, se observa que cuanto mayor es su valor mayor es el % de Extracción de cobalto. Las demás variables presentan efectos estimados positivo (concentración de  $\text{HCl}$  y volumen de lixivante) y negativos (caudal de lixiviación y tamaño de partícula), pero sin superar el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 62(II)).

\* Cromo: La concentración de  $\text{HNO}_3$ , la concentración de  $\text{HCl}$ , la temperatura de lixiviación y el tiempo de sonicación son las variables estadísticamente significativas. Siendo la concentración de  $\text{HNO}_3$  la variable de mayor efecto estimado (39,5). El caudal de lixiviación presenta un efecto estimado negativo, el volumen de lixivante positivo y el tamaño de partícula negativo, aunque estas variables no superan el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 62(III)).

\* Cobre: La concentración de  $\text{HNO}_3$ , la temperatura de lixiviación y el tiempo de sonicación son las variables estadísticamente significativas. Siendo la concentración de  $\text{HNO}_3$  la variable de mayor efecto estimado (44,9). Las demás variables presentan efectos estimados positivos (concentración de  $\text{HCl}$  y volumen de lixivante) y negativos (caudal de lixiviación y tamaño de partícula), pero sin superar el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 62(IV)).

\* Hierro: La concentración de  $\text{HNO}_3$ , la temperatura de lixiviación y el tiempo de sonicación son las variables estadísticamente significativas. Siendo la concentración de  $\text{HNO}_3$  la variable de mayor efecto estimado (42,4). Las demás variables presentan efectos estimados positivos (concentración de  $\text{HCl}$  y volumen de lixivante) y negativos (caudal de lixiviación y tamaño de partícula), pero sin superar el nivel de significación establecido por el método

para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 62(V)).

\* Manganeso: La concentración de  $\text{HNO}_3$ , la temperatura de lixiviación y el tiempo de sonicación son las variables estadísticamente significativas. Siendo la concentración de  $\text{HNO}_3$  la variable de mayor efecto estimado (46,1). Las demás variables presentan efectos estimados positivos (concentración de  $\text{HCl}$  y volumen de lixivante) y negativos (caudal de lixiviación y tamaño de partícula), pero sin superar el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 62(VI)). En el caso del caudal de lixiviación, volumen de lixivante y tamaño de partícula, el efecto estimado presenta un valor muy pequeño (-2,6; 0,8 y 1,0, respectivamente).

\* Níquel: La concentración de  $\text{HNO}_3$ , la temperatura de lixiviación y el tiempo de sonicación son las variables estadísticamente significativas. Siendo la concentración de  $\text{HNO}_3$  la variable de mayor efecto estimado (41,5). Las demás variables presentan efectos estimados positivos (concentración de  $\text{HCl}$  y volumen de lixivante) y negativos (caudal de lixiviación y tamaño de partícula), pero sin superar el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 62(VII)).

\* Plomo: La concentración de  $\text{HNO}_3$ , la temperatura de lixiviación y el tiempo de sonicación son las variables estadísticamente significativas. Siendo la concentración de  $\text{HNO}_3$  la variable de mayor efecto estimado (38,7). Las demás variables presentan efectos estimados positivos (concentración de  $\text{HCl}$  y volumen de lixivante) y negativos (caudal de lixiviación y tamaño de partícula), pero sin superar el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 62(VIII)).

\* Cinc: La concentración de  $\text{HNO}_3$  y la temperatura de lixiviación son las variables estadísticamente significativas. Siendo la concentración de  $\text{HNO}_3$  la variable de mayor efecto estimado (39,6). Las demás variables presentan efectos estimados positivos (concentración de  $\text{HCl}$ , tiempo de sonicación y volumen de lixivante) y negativos (caudal de lixiviación y tamaño de partícula), pero sin superar el nivel de significación establecido por el método

para un 95% de confianza (representado por la línea vertical de la Carta Pareto, Fig. 62(IX)). En el caso del volumen de lixiviante el efecto estimado presenta un valor muy pequeño (0,1).

En función de cada variable:

\* Concentración de ácido nítrico: En todos los casos la concentración de  $\text{HNO}_3$  es una variable estadísticamente significativa con efecto estimado positivo. Esto se debe a su efecto oxidante que mejora el proceso de lixiviación.

\* Concentración de ácido clorhídrico: Es una variable estadísticamente significativa con efecto estimado positivo para la lixiviación del cromo. Para los demás metales no es significativa, aunque su efecto estimado es positivo.

\* Tiempo de sonicación: Es una variable estadísticamente significativa con efecto estimado positivo para la lixiviación de todos los metales excepto para el cinc. Para el Zn no es significativa, aunque su efecto estimado es positivo. Tal y como indican los resultados, cuanto más tiempo permanezca la muestra bajo la acción de la energía de ultrasonidos mayor contacto se produce entre la muestra de pelo y la disolución lixiviante, y por tanto se logra una mayor eficacia en la extracción. Sin embargo, tiempos de sonicación elevados suponen elevados tiempos de análisis, y por lo tanto una reducción de la frecuencia de muestreo.

\* Temperatura de lixiviación: Es una variable estadísticamente significativa con efecto estimado positivo para la lixiviación de todos los metales.

\* Caudal de lixiviación: En ninguno de los casos es una variable estadísticamente significativa y siempre presenta un efecto estimado negativo, lo que indica que la eficacia de la extracción es inversamente proporcional a dicho factor.

\* Volumen de lixiviante: En ninguno de los casos es una variable estadísticamente significativa y siempre presenta un efecto estimado positivo, lo que indica que la eficacia de la extracción es directamente proporcional a dicho factor.



\* Tamaño de partícula: En ninguno de los casos es una variable estadísticamente significativa y siempre presenta un efecto estimado negativo, lo que indica que la eficacia de la extracción es inversamente proporcional a dicho factor.

Debido a que el diseño factorial de Plackett-Burman no permite la evaluación directa de los términos de interacción entre dos o más factores, se eliminaron en cada caso del sistema aquellos factores que eran considerados originalmente, pero que no parecían tener influencia sobre el mismo:

- Cadmio: concentración de HCl, tiempo de sonicación, caudal de lixiviación, volumen de lixivante y tamaño de partícula.
- Cobalto: concentración de HCl, caudal de lixiviación, volumen de lixivante y tamaño de partícula.
- Cromo: caudal de lixiviación, volumen de lixivante y tamaño de partícula.
- Cobre: concentración de HCl, caudal de lixiviación, volumen de lixivante y tamaño de partícula.
- Hierro: concentración de HCl, tiempo de sonicación, caudal de lixiviación y volumen de lixivante.
- Manganeso: concentración de HCl, tiempo de sonicación, caudal de lixiviación y volumen de lixivante.
- Níquel: concentración de HCl, caudal de lixiviación, volumen de lixivante y tamaño de partícula.
- Plomo: concentración de HCl, caudal de lixiviación, volumen de lixivante y tamaño de partícula.
- Cinc: concentración de HCl, tiempo de sonicación, caudal de lixiviación, volumen de lixivante y tamaño de partícula.

Así, se reevaluó el modelo ahora reducido, pudiéndose considerar las interacciones de segundo orden. La Figuras 64(I-IX) recogen los resultados obtenidos. Como se muestra en estas figuras, ninguna interacción de segundo orden es estadísticamente significativa, por lo que se puede variar el valor de una de estas variables sin que se vea afectado el valor de cualquier otra.

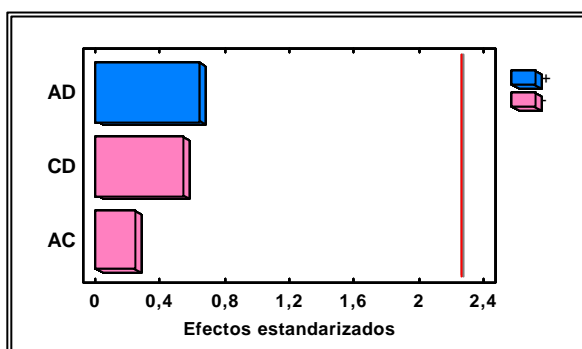
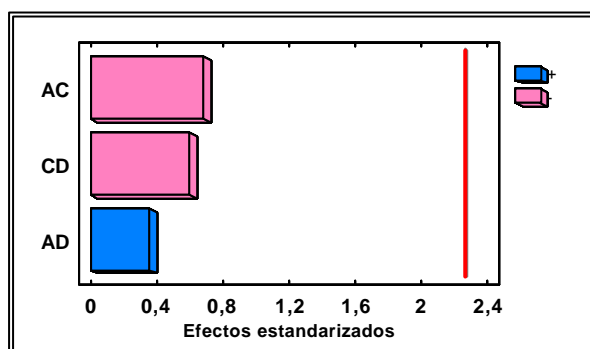


Fig. 64(I).- Lixiviación del cadmio      Fig. 64(II).- Lixiviación del cobalto  
 Carta Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [HNO<sub>3</sub>]; B, [HCl]; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante; G, tamaño de partícula

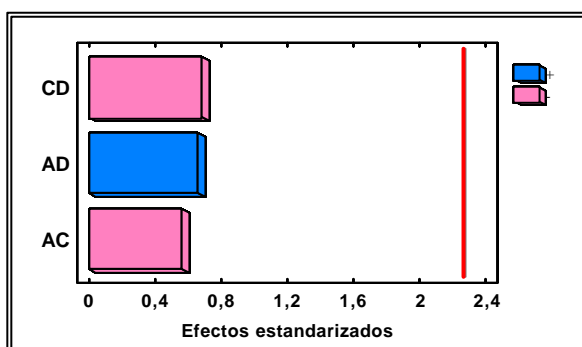
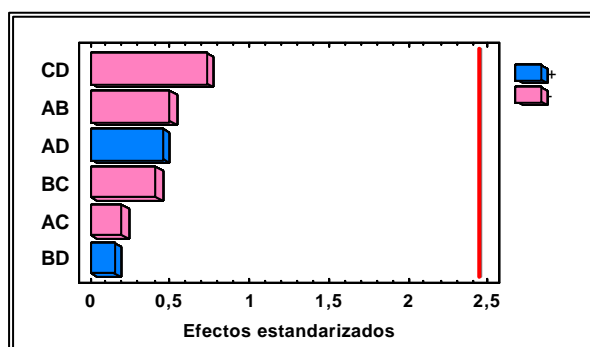


Fig. 64(III).- Lixiviación del cromo      Fig. 64(IV).- Lixiviación del cobre  
 Carta Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [HNO<sub>3</sub>]; B, [HCl]; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixiviante; G, tamaño de partícula

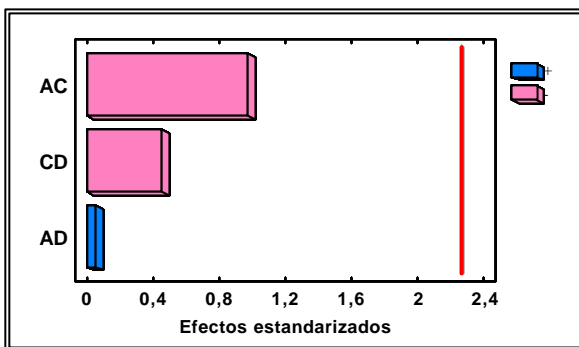
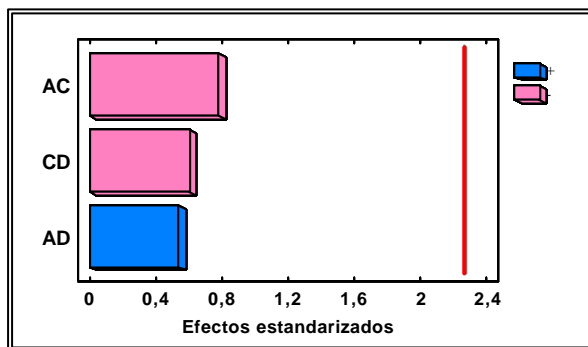


Fig. 64(V).- Lixiviación del hierro      Fig. 64(VI).-Lixiviación del manganeso  
 Carta Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante; G, tamaño de partícula

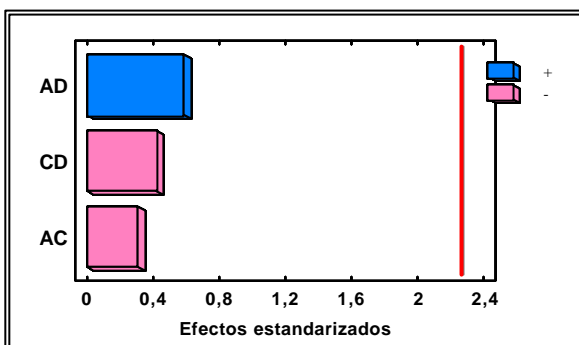
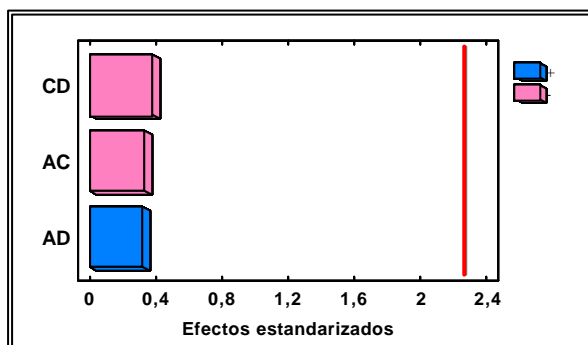


Fig. 64(VII).- Lixiviación del níquel      Fig. 64(VIII).- Lixiviación del plomo  
 Carta Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante; G, tamaño de partícula

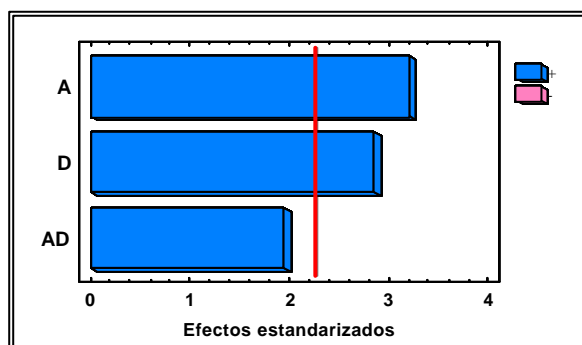


Fig. 64(IX).- Lixiviación del cinc

Carta Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; B,  $[\text{HCl}]$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación; E, caudal de lixiviación; F, volumen de lixivante; G, tamaño de partícula

Todo lo concluido a partir de la Carta Pareto se corrobora con las gráficas de superficie de respuesta que proporciona el análisis de Plackett-Burman. En estas gráficas se demuestra que en todos los casos la máxima eficacia en la extracción se obtiene para el valor máximo de concentración de ácido nítrico y de temperatura de lixiviación, también para el Cd, Co, Cu, Fe, Mn y Pb para el máximo valor de tiempo de sonicación, y para el Cr para una variable más, la concentración de HCl (Figura 65 (I- XXIX)).

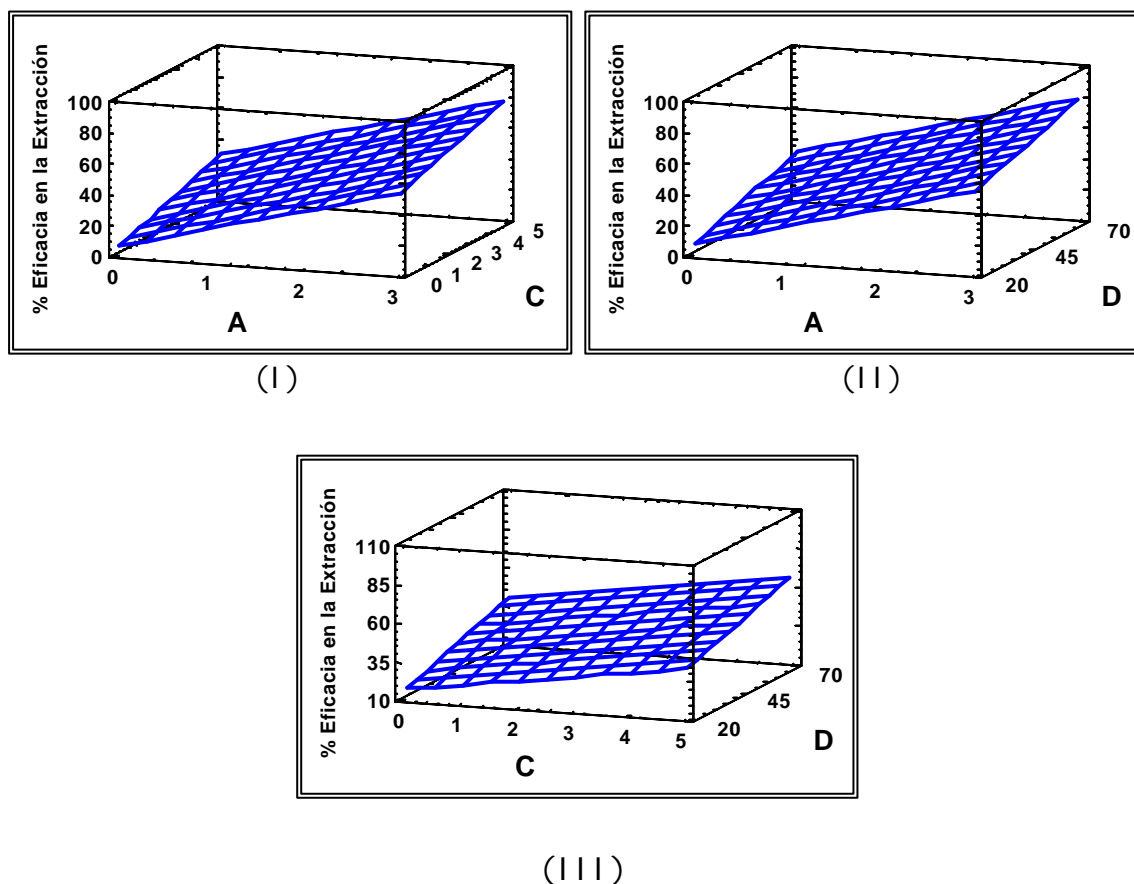


Figura 65 (I-III).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de cadmio: (I) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y tiempo de sonicación (C); (II) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y temperatura de lixiviación (D); (III) tiempo de sonicación (C) y temperatura de lixiviación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño

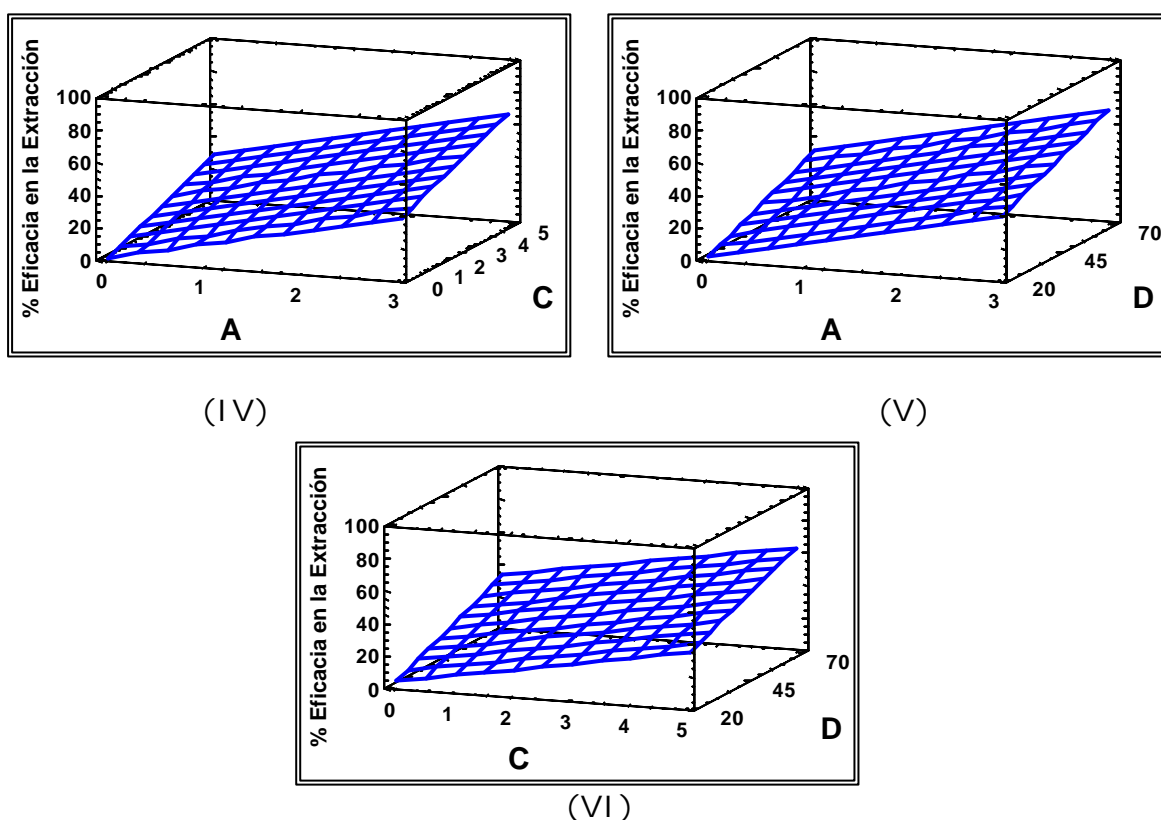
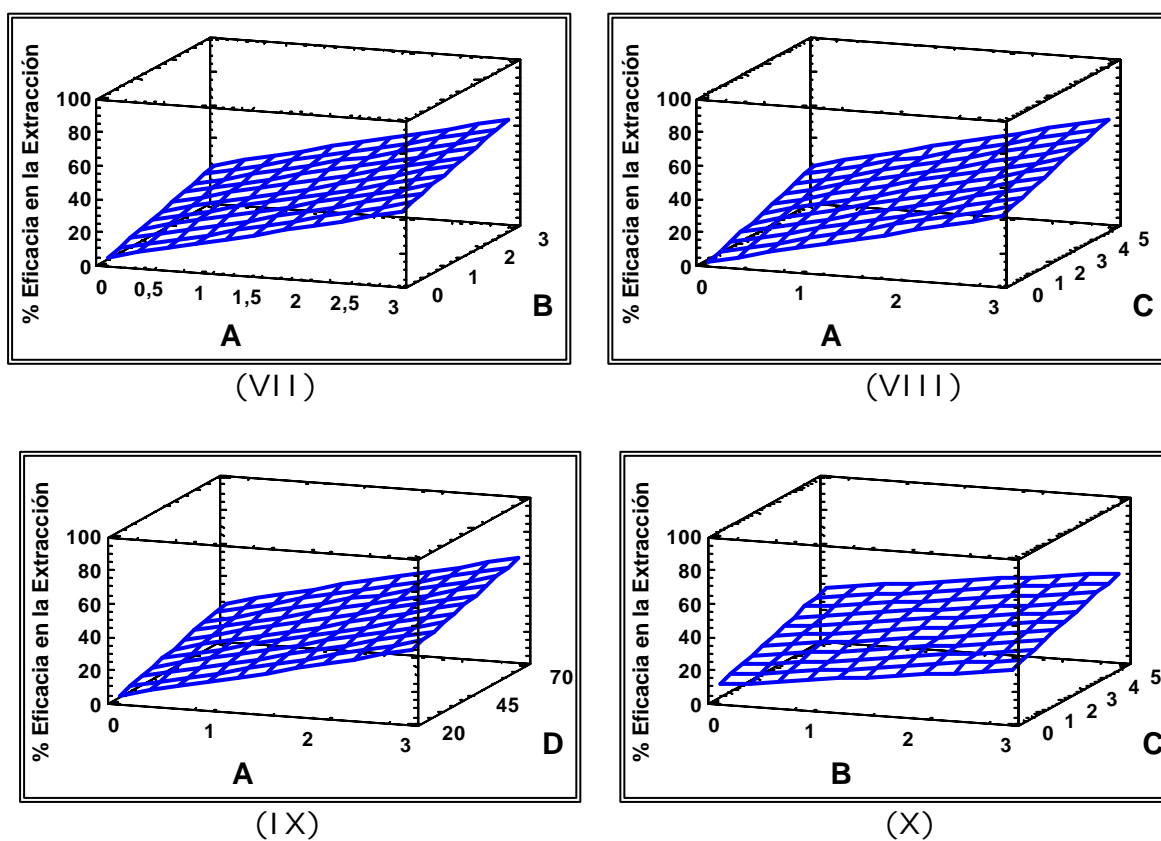
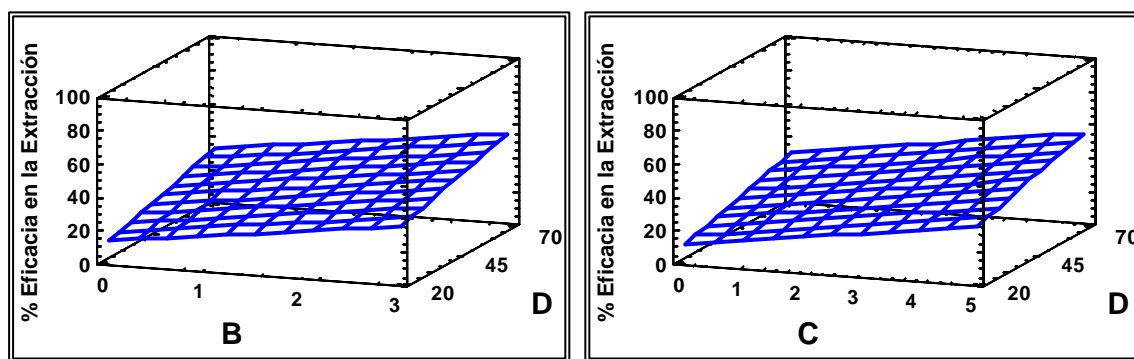


Figura 65 (IV-VI).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de cobalto: (IV) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y tiempo de sonicación (C); (V) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y temperatura de lixiviación (D); (VI) tiempo de sonicación (C) y temperatura de lixiviación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño

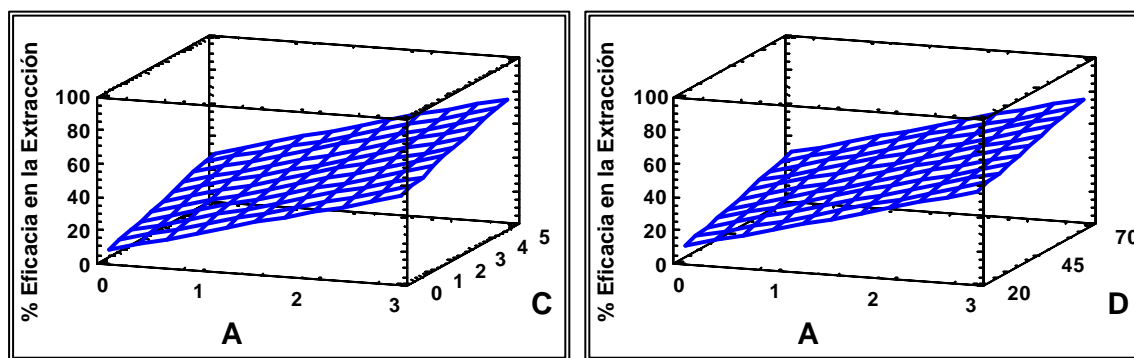




(XI)

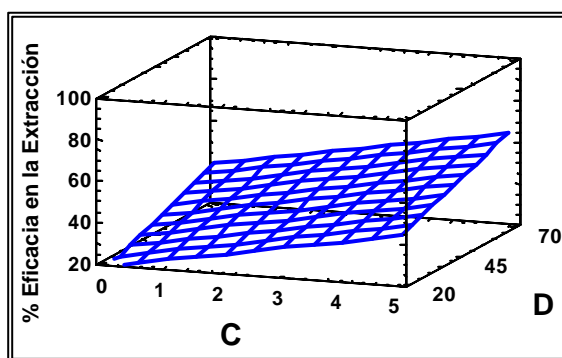
(XII)

Figura 65 (VII-XII).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de cromo: (VII) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y concentración de HCl (B); (VIII) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y tiempo de sonicación (C); (IX) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y temperatura de lixiviación (D); (X) concentración de HCl (B) y tiempo de sonicación (C); (XI) concentración de HCl (B) y temperatura de lixiviación (D); (XII) tiempo de sonicación (C) y temperatura de lixiviación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño



(XIII)

(XIV)



(XV)

Figura 65 (XIII-XV).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de cobre: (XIII) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y tiempo de sonicación (C); (XIV) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y temperatura de lixiviación (D); (XV) tiempo de sonicación (C) y temperatura de lixiviación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño

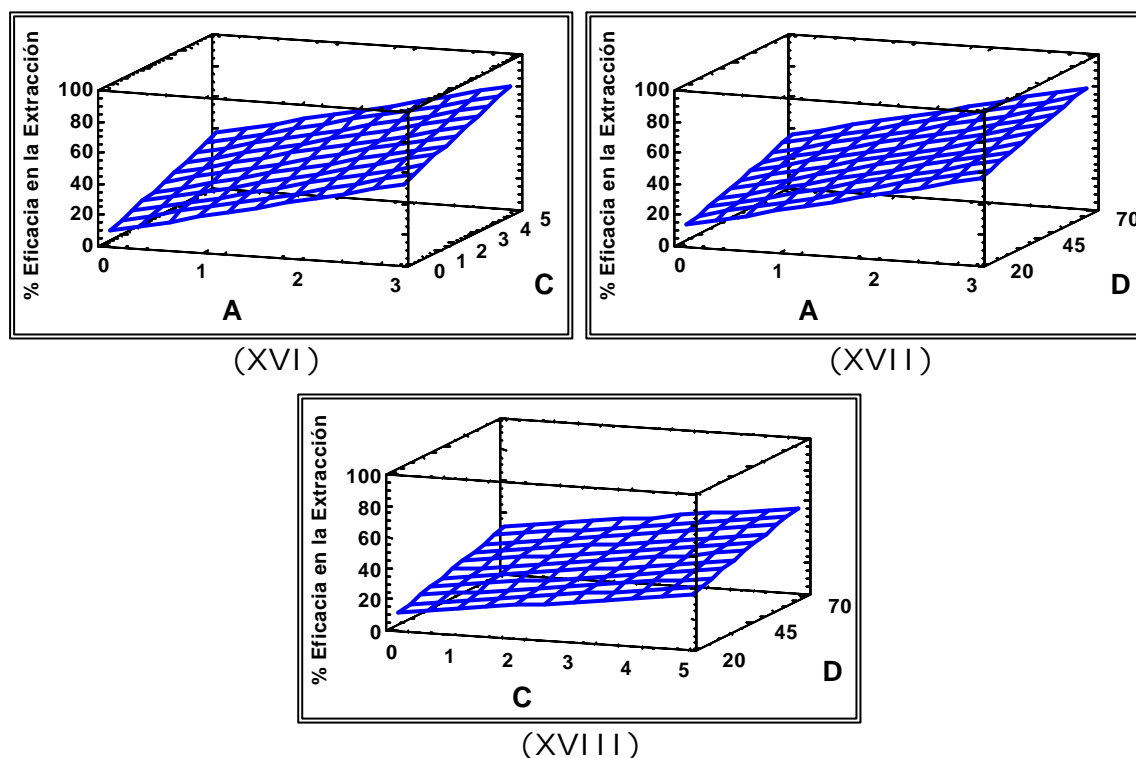


Figura 65 (XIII-XV).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de hierro: (XVI) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y tiempo de sonicación (C); (XVII) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y temperatura de lixiviación (D); (XVIII) tiempo de sonicación (C) y temperatura de lixiviación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño

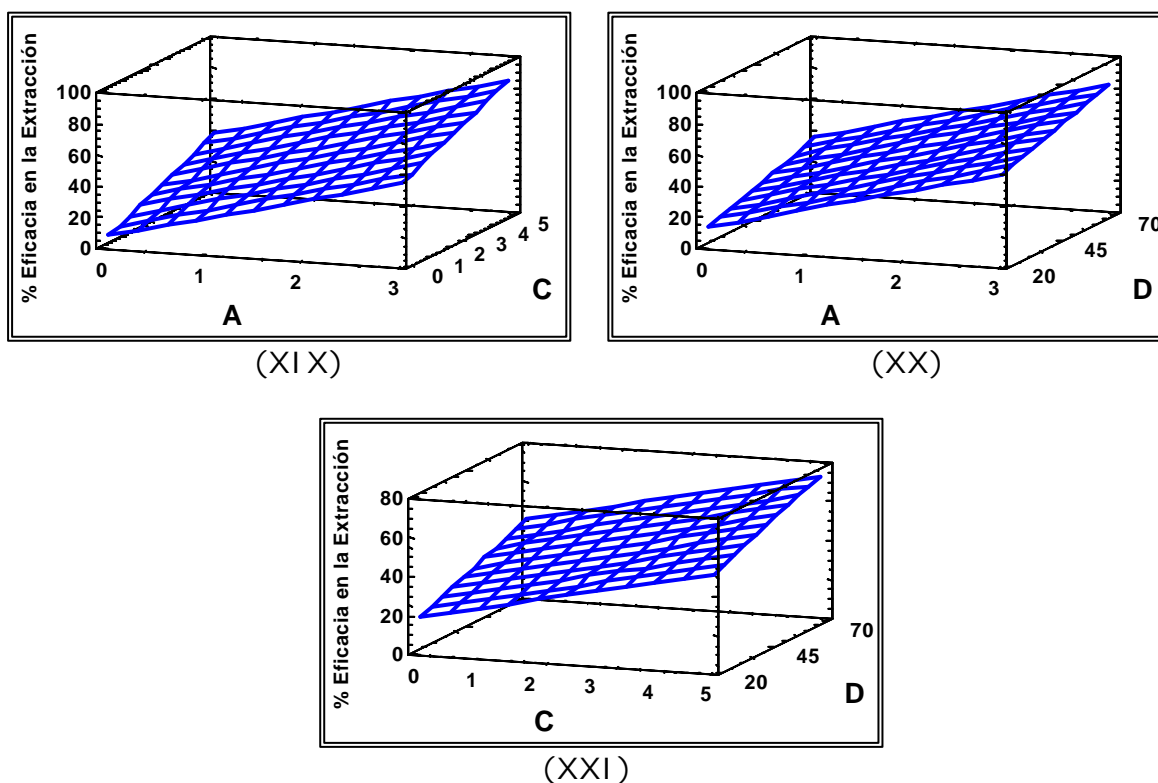


Figura 65 (XIII-XV).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de manganeso: (XIX) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y tiempo de sonicación (C); (XX) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y temperatura de lixiviación (D); (XXI) tiempo de sonicación (C) y temperatura de lixiviación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño

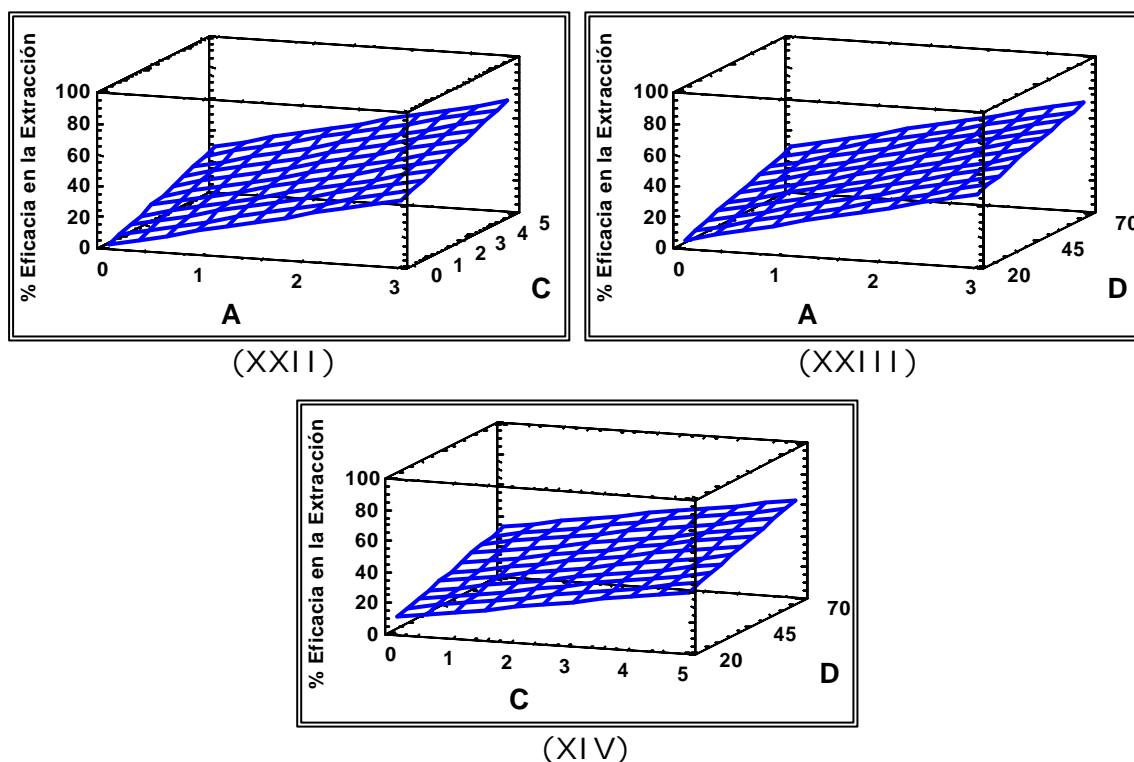


Figura 65 (XIII-XV).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de níquel: (XXII) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y tiempo de sonicación (C); (XXIII) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y temperatura de lixiviación (D); (XIV) tiempo de sonicación (C) y temperatura de lixiviación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño

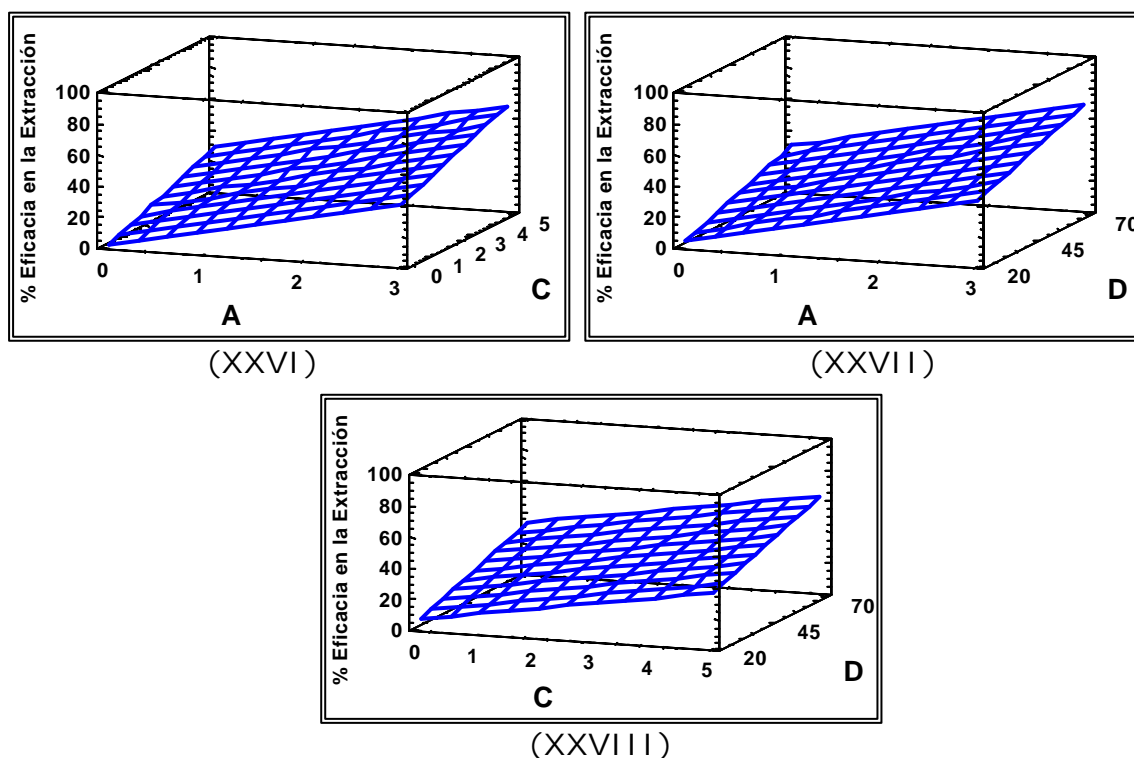


Figura 65 (XIII-XV).- Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de plomo: (XXVI) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y tiempo de sonicación (C); (XXVII) concentración de HNO<sub>3</sub> (A) y temperatura de lixiviación (D); (XXVIII) tiempo de sonicación (C) y temperatura de lixiviación (D).



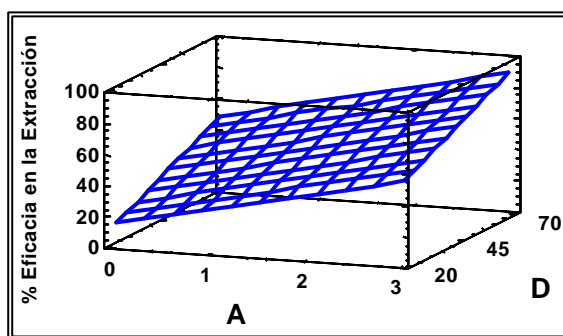

$$(XXIX)$$

Figura 65 (XXIX).- Superficie de respuesta proporcionada por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de cinc: (XXIX) concentración de  $\text{HNO}_3$  (A) y temperatura de lixiviación (D). Las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño

Después de haber realizado el análisis de los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Plackett-Burman, los valores optimizados para cada una de las variables serían los recogidos en la Tabla LXVIII.

Tabla LXVII I.- Condiciones establecidas para cada variable según el diseño de Plackett-Burman

[illegible]

### 3.2. Diseños de Superficie de Respuesta

Como los diseños de screening sólo indican las tendencias de cada una de las variables hacia el valor óptimo, se procedió a utilizar un diseño factorial de superficie de respuesta.

Antes de realizar el diseño factorial de superficie de respuesta, se tuvo en cuenta lo siguiente para cada variable:

- *Volumen de lixiviante*: En todos los casos el diseño de screening establece como óptimo 5 mL. Volúmenes mayores implicarían una mayor dilución, y por tanto, una disminución en la sensibilidad.
- *Caudal de lixiviante*: El diseño de Screening establece como óptimo 3 mL/min. La utilización de un caudal mayor o menor no implicaría ninguna ventaja en cuanto a características analíticas de los métodos desarrollados.
- *Concentración de nítrico y de clorhídrico*: En el caso de estas concentraciones, se observa un efecto estimado positivo que indica que a mayor concentración se obtienen mejores resultados. La concentración de nítrico es una variable estadísticamente significativa en todos los casos, sin embargo, elevadas concentraciones de ácido pueden causar daños importantes en el nebulizador del espectrofotómetro de absorción atómica con llama. Además, si se tiene en cuenta los experimentos nº 1 para el Cd, el nº 13 para el Co, el nº 7 para el Cu, el nº 3 para el Fe, el nº 5 para el Mn, el nº 9 para el Ni, el nº 4 para el Pb y el nº 8 para el Zn del diseño factorial de Plackett-Burman (en todos los metales excepto para el cromo) se obtienen % de Eficacia en la Extracción entre 97,1-102,6%. Por tanto, en estos casos, la disolución lixiviante podría ser únicamente ácido nítrico 3 M.
- *Tamaño de partícula de la muestra de pelo*: En todos los casos el diseño de screening establece como óptimo el valor de tamaño de partícula más pequeño (0,5 cm). La selección del tamaño de partícula implica una mayor manipulación de la muestra, lo que se traduce en mayor posibilidad de contaminación y consumo de tiempo para el análisis.

Así, para el Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn, con el objetivo de afinar el valor óptimo del tiempo de sonicación y de la temperatura de lixiviación, se procedió a realizar un diseño factorial de superficie de respuesta. En la Tabla LXIX se muestra el valor considerado como óptimo para las demás variables.

Tabla LXIX.- Valores óptimos tomados para las variables no consideradas en el diseño factorial de superficie de respuesta para Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS							
	Cd	Co	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
[HNO <sub>3</sub> ] (M)	3	3	3	3	3	3	3	3
[HCl] (M)	0	0	0	0	0	0	0	0
Caudal de lixiviación (mL/min)	3	3	3	3	3	3	3	3
Volumen de lixivante (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
Tamaño de partícula (cm)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

En el caso del cromo, como en el diseño de Plackett-Burman el máximo % de Eficacia en la Extracción que se obtuvo fue del 92,6%, las variables consideradas para optimizar en el diseño factorial de superficie de respuesta fueron las que resultaron estadísticamente significativas en el diseño de Plackett-Burman: concentración de ácido nítrico, temperatura de lixiviación y tiempo de sonicación. En el caso de la concentración de HCl, se tomó como valor óptimo cero para determinar si sólo aumentando la concentración de ácido nítrico se conseguía extraer todo el cromo, y así realizar menor número de experimentos. En la Tabla LXX se muestra el valor considerado como óptimo para las demás variables.

Tabla LXX.- Valores óptimos tomados para las variables no consideradas en el diseño factorial de superficie de respuesta para el Cr

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS
[HCl] (M)	0
Caudal de lixiviación (mL/min)	3
Volumen de lixivante (mL)	5
Tamaño de partícula (cm)	0,5

La Tabla LXXI expone los valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta para Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn, y la Tabla LXXII los valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta para el Cr.

Tabla LXXI.- Valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta para Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn

VARIABLE	CLAVE	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
Tiempo de sonicación	C	3 min	9 min
Temperatura de lixiviación	D	30 °C	80 °C

Tabla LXXII.- Valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta para el Cr

VARIABLE	CLAVE	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
[HNO <sub>3</sub> ]	A	3	5
Tiempo de sonicación	C	3 min	9 min
Temperatura de lixiviación	D	30 °C	80 °C

Los valores máximo y mínimo establecidos para cada variable se han elegido en función de estudios previos y de los resultados obtenidos anteriormente en el diseño de screening.

La variable respuesta (% eficacia en la extracción) se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Eficacia en la Extracción} = \frac{[\text{Metal}]_{\text{determinada por el método propuesto}}}{[\text{Metal}]_{\text{determinada por el método oficial}}} \times 100$$

Para Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn, el diseño factorial aplicado de superficie de respuesta es un diseño central composicional  $2^2$  + estrella que implica realizar 10 experimentos (Statgraphics Plus 5.1). Las características del diseño son las siguientes:

- Tipo de Diseño: Superficie de respuesta
- Nombre del Diseño: Central Composicional  $2^2$  + estrella
- Características del diseño: ortogonal
- Número de factores experimentales: 2
- Puntos centrales: 2
- Número de experimentos: 10
- Error grados de libertad: 4
- Aleatorio: Si
- Distancia axial,  $\alpha = 1,07809$

Para el Cr, el diseño factorial aplicado de superficie de respuesta es un diseño central composicional  $2^3$  + estrella que implica realizar 16 experimentos (Statgraphics Plus 5.1). Las características del diseño son las siguientes:

- Tipo de Diseño: Superficie de respuesta
- Nombre del Diseño: Central Composicional  $2^3 +$  estrella
- Características del diseño: ortogonal
- Número de factores experimentales: 3
- Puntos centrales: 2
- Número de experimentos: 16
- Error grados de libertad: 6
- Aleatorio: Si
- Distancia axial,  $\alpha = 1,28719$

Las Tablas LXXIII (1-9) muestran las matrices experimentales del diseño incluyendo la variable respuesta (% Eficacia en la Extracción) obtenida en cada experimento por triplicado.

Una vez obtenidos los resultados experimentales se introducen en cada diseño central composicional para obtener la información necesaria para obtener los valores óptimos de cada variable. Esta búsqueda se llevará acabo con ayuda de las superficies de respuesta estimadas para el conjunto de dos variables que se pueden ver en la Figura 67.

Tabla LXXIII (1).- Matriz del diseño central composicional  $2^2 +$  estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del cadmio. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	9,23427	55	97,5
2	3	30	71,5
3	3	80	95,5
4	2,76573	55	90,1
5	9	30	80,0
6	6	55	95,5
7	9	80	101,2
8	6	28,0478	77,2
9	6	81,9522	97,5
10	6	55	95,5

Tabla LXXIII (2).- Matriz del diseño central composicional  $2^2$  + estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del cobalto. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	6	55	95,2
2	3	30	69,1
3	9,23427	55	98,7
4	3	80	93,5
5	6	81,9522	96,5
6	9	30	84,2
7	9	80	98,7
8	6	28,0478	72,0
9	2,76573	55	87,1
10	6	55	95,2

Tabla LXXIII (3).- Matriz del diseño central composicional  $2^3$  + estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del cromo. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

Experimento	A	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	4	6	55	91,9
2	3	9	80	90,9
3	5,28719	6	55	87,9
4	5	9	30	85,6
5	5	3	30	56,8
6	3	3	80	84,2
7	3	3	30	44,3
8	2,71281	6	55	80,6
9	5	9	80	99,8
10	4	6	87,1797	97,9
11	5	3	80	92,6
12	3	9	30	50,2
13	4	9,86157	55	85,6
14	4	2,13843	55	82,4
15	4	6	22,8203	48,7
16	4	6	55	88,2

Tabla LXXIII (4).- Matriz del diseño central composicional  $2^2 +$  estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del cobre. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	6	55	95,1
2	3	30	79,5
3	6	55	95,1
4	9	80	99,8
5	6	81,9522	97,7
6	9	30	85,2
7	3	80	99,8
8	6	28,0478	81,3
9	2,76573	55	87,1
10	9,23427	55	99,8

Tabla LXXIII (5).- Matriz del diseño central composicional  $2^2 +$  estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del hierro. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	6	55	96,7
2	3	30	77,8
3	2,76573	55	86,7
4	6	81,9522	95,9
5	9,23427	55	97,3
6	6	55	96,7
7	9	80	97,3
8	6	28,0478	81,0
9	3	80	97,3
10	9	30	81,0



Tabla LXXIII (6).- Matriz del diseño central composicional  $2^2 +$  estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del manganeso. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	3	30	75,3
2	6	55	95,8
3	9,23427	55	98,1
4	3	80	98,1
5	6	55	95,8
6	9	30	80,4
7	9	80	98,1
8	6	28,0478	79,2
9	2,76573	55	84,8
10	6	81,9522	98,1

Tabla LXXIII (7).- Matriz del diseño central composicional  $2^2 +$  estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del níquel. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	9,23427	55	98,1
2	6	28,0478	64,3
3	6	81,9522	97,1
4	2,76573	55	71,5
5	6	55	95,4
6	9	30	71,5
7	9	80	98,1
8	3	80	92,4
9	3	30	51,7
10	6	55	95,4

Tabla LXXIII (8).- Matriz del diseño central composicional  $2^2 +$  estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del plomo. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

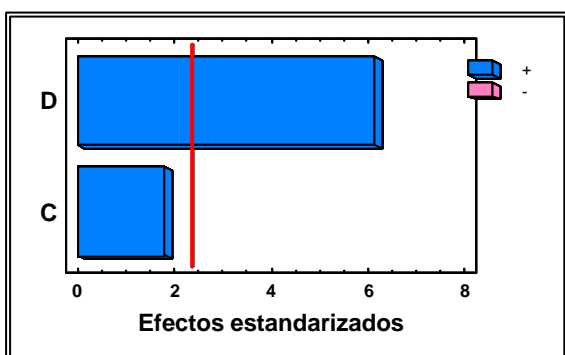
Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	6	55	96,9
2	3	30	78,4
3	9	30	83,8
4	3	80	99,1
5	6	55	96,9
6	6	81,9522	99,1
7	9	80	99,1
8	9,23427	55	99,1
9	2,76573	55	89,8
10	6	28,0478	80,3

Tabla LXXIII (9).- Matriz del diseño central composicional  $2^2 +$  estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación del cinc. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación

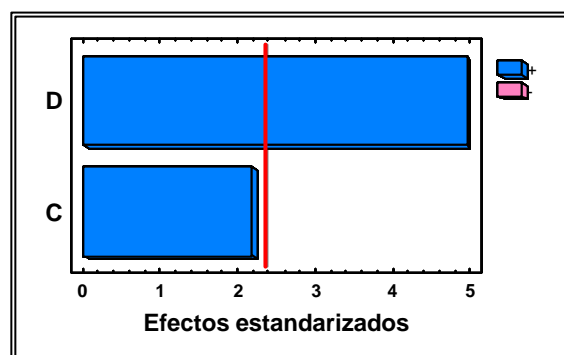
Experimento	C	D	% Eficacia en la Extracción
1	9	80	97,1
2	3	30	82,5
3	9,23427	55	99,1
4	2,76573	55	98,1
5	6	55	99,1
6	9	30	93,8
7	6	81,9522	99,1
8	6	28,0478	93,8
9	6	55	99,1
10	3	80	98,1

### 3.2.1. Conclusiones del diseño de superficie de respuesta

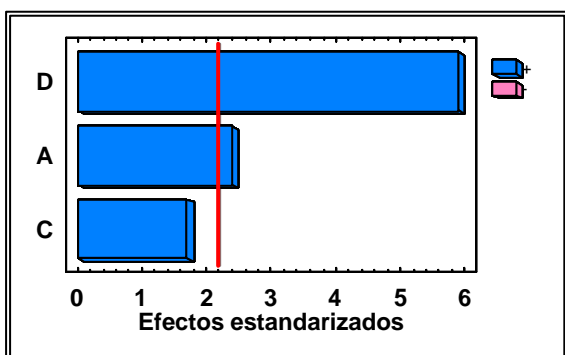
El análisis de los resultados de la Tablas LXXIII (1-9) da lugar a las Cartas Pareto que se muestran en las Figura 66 (I-IX). Como se puede observar, la temperatura de lixiviación (D) en todos los casos, excepto para el Zn, es estadísticamente significativa y está afectada por un signo positivo. El tiempo de sonicación (C) es una variable estadísticamente significativa sólo en el caso del Ni, y presenta un signo positivo. Para el cromo, la concentración de ácido nítrico es una variable estadísticamente significativa y con signo positivo.



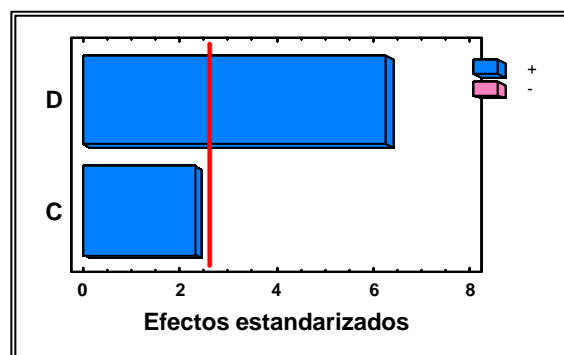
(I)



(II)



(III)



(IV)

Figura 66 (I-IV).- Cartas Pareto estandarizadas de los efectos principales en el diseño factorial. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación. La línea vertical indica el límite de significación estadística. (I) Cadmio; (II) Cobalto; (III) Cromo; (IV) Cobre

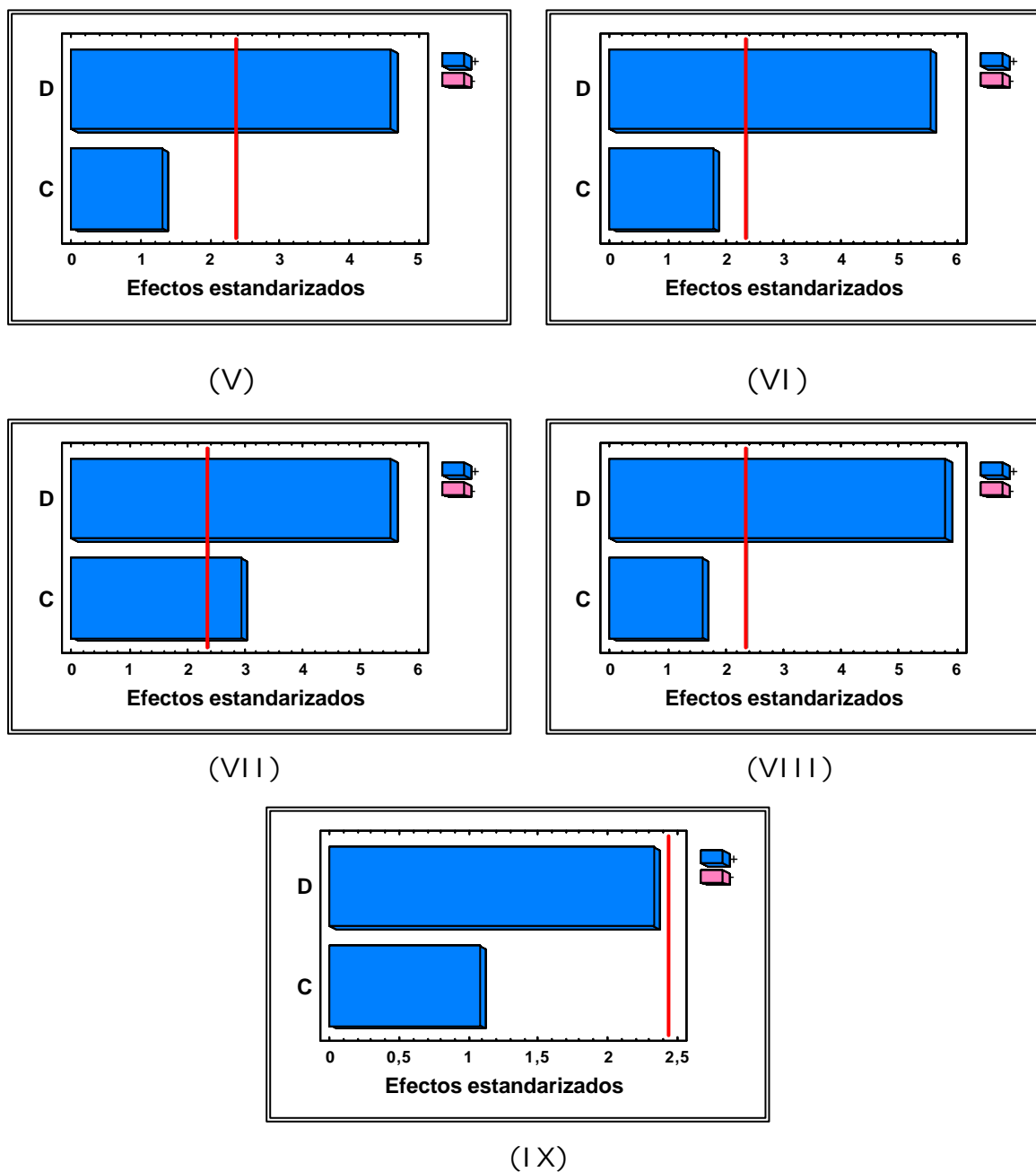
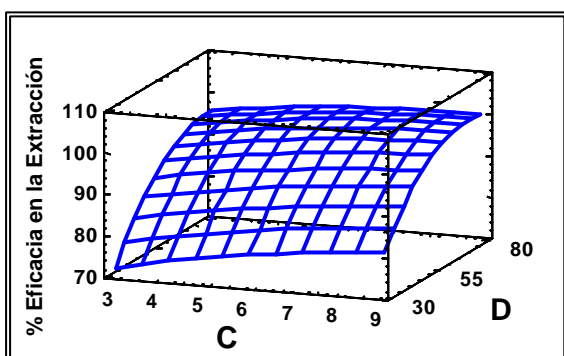
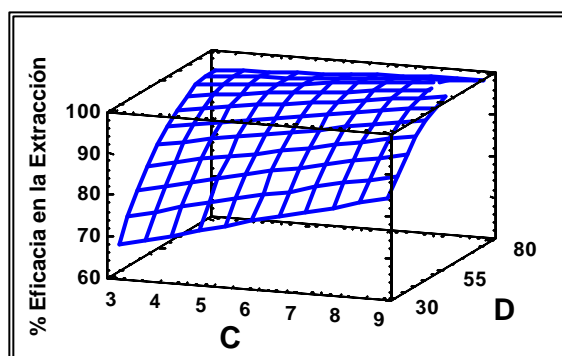


Figura 66 (V-IX).- Cartas Pareto estandarizadas de los efectos principales en el diseño factorial. C, tiempo de sonicación; D, temperatura de lixiviación. La línea vertical indica el límite de significación estadística. (V) Hierro; (VI) Manganeso; (VII) Níquel; (VIII) Plomo; (IX) Cinc

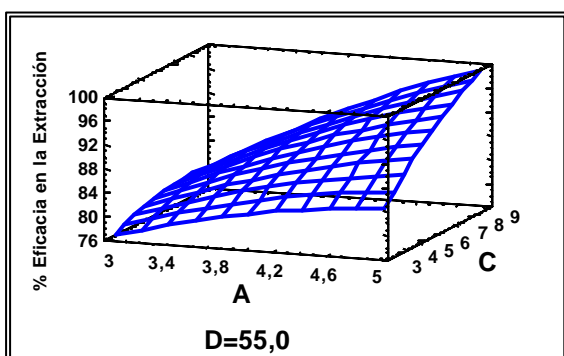
Las Figuras 67 (I-IX) muestran las superficies de respuesta estimadas obtenidas por el modelo experimental para las variables estudiadas: tiempo de sonicación (C) y temperatura de lixiviación (D) en el caso de Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn, y concentración de ácido nítrico (A), tiempo de sonicación (C) y temperatura de lixiviación (D) para el Cr.



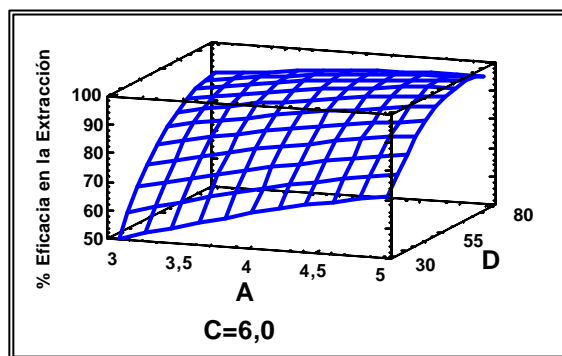
(I)



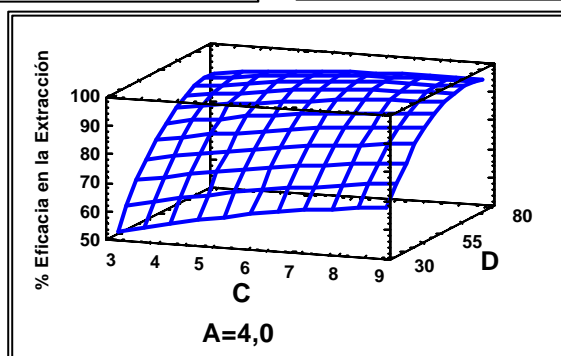
(II)



D=55,0

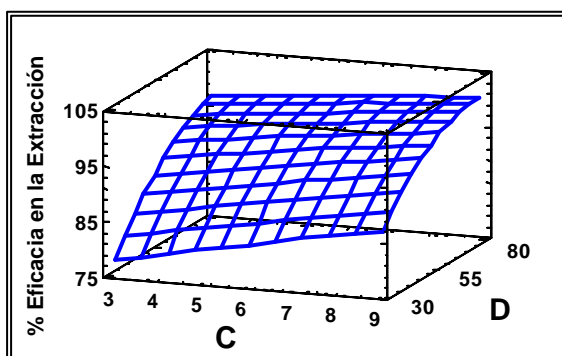


C=6,0

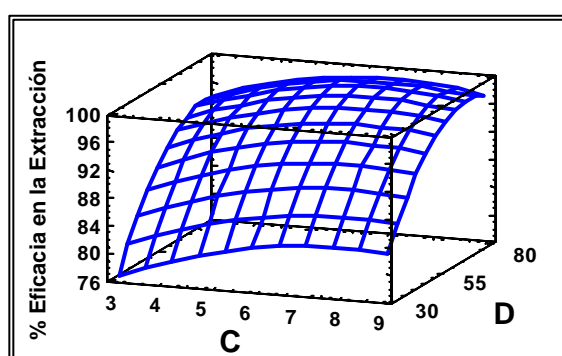


A=4,0

(III)



(IV)



(V)

Figura 67 (I-III).- Superficies de respuesta para el modelo. A,  $[\text{HNO}_3]$ ; C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación. (I) Cadmio; (II) Cobalto; (III) Cromo; (IV) Cobre; (V) Hierro

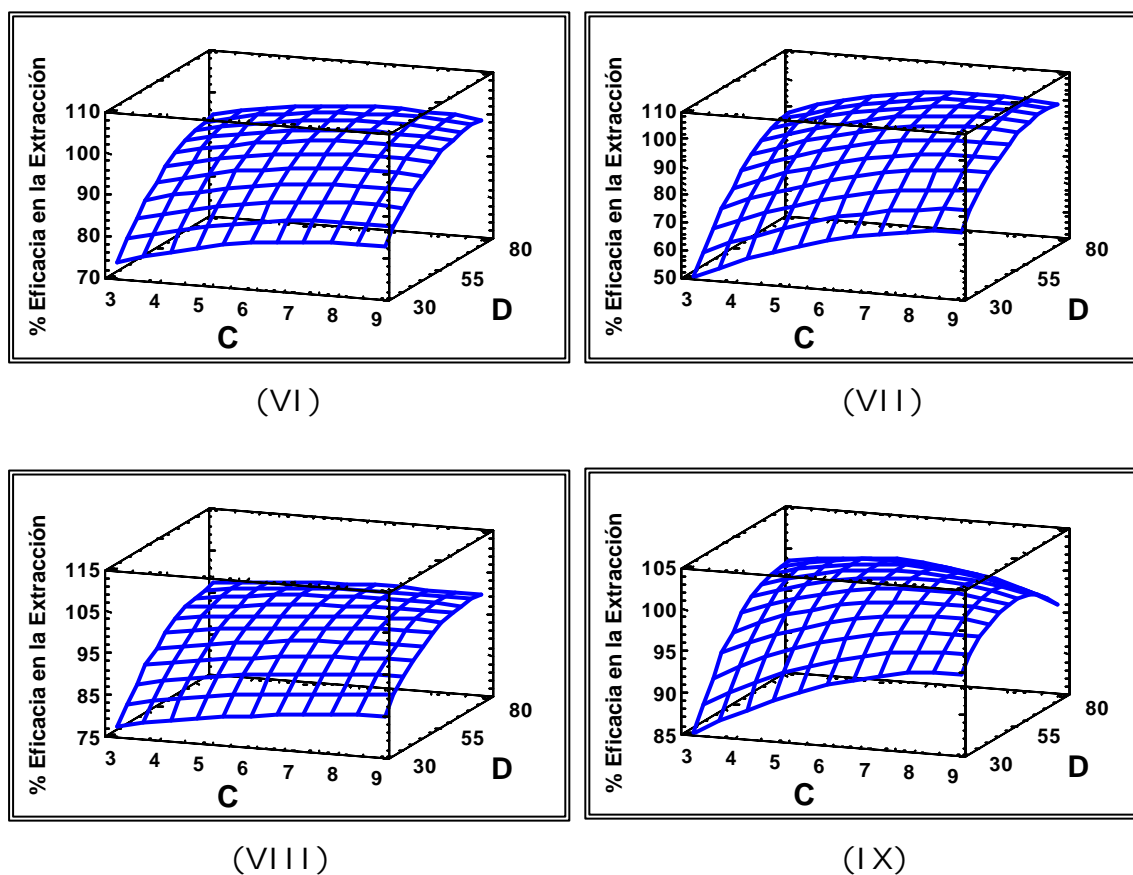


Figura 67 (IV-IX).- Superficies de respuesta para el modelo. C, temperatura de lixiviación; D, tiempo de sonicación. (VI) Manganeso; (VII) Níquel; (VIII) Plomo; (IX) Cinc

Los efectos estimados para cada variable se muestran en la Tabla LXXIV.

Tabla LXXIV.- Efectos estimados para las variables estudiadas

VARIABLE	EFECTO ESTIMADO								
	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
[HNO <sub>3</sub> ] (M)	-	-	13,2	-	-	-	-	-	-
Tiempo de sonicación, C (min)	6,4	9,4	9,3	6,1	4,6	6,2	17,1	4,9	3,6
Temperatura de lixiviación, D (°C)	21,8	21,6	32,7	16,6	16,4	19,3	32,5	17,8	7,8

Como se puede observar en la Figuras 67 (I-IX), la eficacia de la extracción es directamente proporcional a la temperatura (D) y al tiempo de sonicación (C). En el caso del cromo, la eficacia de la extracción es también directamente proporcional a la concentración de ácido nítrico (A).

A partir de este diseño, se obtienen los valores óptimos. Como era de esperar y a la vista de las superficies de respuesta obtenidas (Figuras 67 (I-IX)), se encuentran los valores óptimos de las variables dentro de los intervalos de trabajo que previamente se habían fijado. Estos valores óptimos se muestran en la Tabla LXXV y se eligieron con el objetivo de alcanzar un % eficacia en la extracción cuantitativo (mayor que un 95%) en el menor tiempo posible para conseguir que la frecuencia de muestreo sea lo más elevada posible. Así, también es posible extraer el cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel, plomo y cinc a menor temperatura: 60, 60, 70, 60, 60, 60, 60, 60 y 50°C, respectivamente, pero si el tiempo de sonicación era de 1 minuto más.

Tabla LXXV.- Valores óptimos para las variables según cada diseño central compositacional

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS								
	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
[HNO <sub>3</sub> ] (M)	-	-	4	-	-	-	-	-	-
Tiempo de sonicación, C (min)	5	5	5	4	4	4	5	3	3
Temperatura de lixiviación, D (°C)	70	70	80	70	70	70	70	70	60

Como en el diseño de superficie de respuesta el menor tiempo de sonicación estudiado fue de 3 min, se estudió la posibilidad de reducirlo incrementando la temperatura de lixiviación para el cadmio, cobalto, cobre, hierro, manganeso, níquel, plomo y cinc. De esta manera, los resultados

obtenidos demostraron que para el cadmio, cobalto y níquel, si se aumentaba la temperatura a 80 °C, el tiempo de sonicación podía ser de 4 minutos. Para cobre, hierro y manganeso aumentando la temperatura hasta 80°C, el tiempo de sonicación puede ser de 3 minutos, para el plomo y el cinc incrementándolo hasta 80°C y 70°C, respectivamente, puede ser de 2 minutos. Sin embargo, si se utilizan tiempos menores y se aumenta la temperatura de lixiviación, éstos no son suficientes para alcanzar un % Eficacia en la Extracción cuantitativo.

Como los experimentos del diseño de superficie de respuesta se han realizado con un caudal de lixivante de 3 mL/min (establecido como óptimo en el diseño de screening) y la utilización de un caudal mayor o menor no implicaría ninguna ventaja en cuanto a características analíticas de los métodos desarrollados, se escoge como óptimo este caudal.

En el caso del tamaño de partícula como según el diseño de screening en ninguno de los casos es una variable estadísticamente significativa y aunque presenta un efecto estimado negativo, éste no es muy elevado (-1,0 a -15,1), se estudió la posibilidad de utilizar tamaños de partícula de muestra mayores de 0,5 cm. Así, se ha demostrado realizando ensayos fuera del marco del diseño utilizando el valor optimizado de las demás variables que si el tamaño de muestra era hasta 1 cm, éste no influía en la extracción de los metales de la muestra de pelo.

Por último, con el objetivo de intentar reducir el volumen de lixivante, y así conseguir alcanzar una mayor sensibilidad, y dado que esta variable presentaba en el diseño de screening un valor estimado que aunque positivo era muy pequeño (0,1 -12,3) (Tabla LXVII), se realizaron ensayos fuera del marco del diseño utilizando el valor optimizado de las demás variables. Así se demostró que un volumen de 2 mL de disolución lixivante es suficiente para alcanzar un % de Eficacia en la Extracción cuantitativo. Sin embargo, con volúmenes más pequeños (1,5 mL), los % de Eficacia en la Extracción alcanzados se reducen a valores entre 64,7 - 81,3%.

En resumen, los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso de extracción de los distintos metales de la muestra de pelo se muestran en la Tabla LXXVI.



Tabla LXXVI.- Valores óptimos para las variables implicadas en el proceso de extracción de los distintos metales de la muestra de pelo

	VALORES ÓPTIMOS								
VARIABLE	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
[HNO <sub>3</sub> ] (M)	3	3	4	3	3	3	3	3	3
[HCl] (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tiempo de sonicación (min)	4	4	5	3	3	3	4	2	2
Temperatura de lixiviación (°C)	80	80	80	80	80	80	80	80	70
Caudal de lixiviación (mL/min)	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Volumen de lixiviante (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tamaño de partícula (cm)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Una vez establecidos los valores óptimos para realizar la extracción de los metales de la muestra de pelo se procedió a realizar el estudio de la cantidad de muestra, ya que esos valores óptimos se establecieron con 100 mg de muestra en el caso de Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni y Pb, 50 mg de muestra para la determinación de Fe y 10 mg de muestra para la determinación de Zn. Se supone que con cantidades menores de muestra las condiciones serían las mismas, pero fue interesante conocer la máxima cantidad de muestra que se podía utilizar, sobre todo para la determinación de aquellos metales presentes en la muestra con pequeña concentración y/o poca sensibilidad de la técnica de determinación utilizada (FAAS) (Cd, Co, Cr, Ni y Pb). Así se demostró que cantidades de muestra mayores de 125 mg crean una presión excesiva en el sistema FIA. Además, cuanto mayor es la cantidad de muestra, más tiempo se tarda en rellenar la minicolumna, lo cual repercute negativamente en la frecuencia de muestreo de la metodología desarrollada.

#### 4.- OPTIMIZACIÓN DE LOS RESTANTES PARÁMETROS DEL SISTEMA FIA

Como en la optimización de la extracción de los metales del filtro de captación de aire, también en este caso en los diseños experimentales sólo se han considerado las variables que afectan al proceso continuo de lixiviación. Al ser el sistema FIA de extracción utilizado similar al empleado para la determinación de metales en humos de soldadura, los valores óptimos de los parámetros del sistema FIA fueron los obtenidos previamente (p. 152-153).

*a) Longitud del reactor de mezcla:* 398 cm, longitud correspondiente a 2 mL de lixiviado.

*b) Bucle de inyección:* 250  $\mu$ L.

*c) Caudales del nebulizador y del portador:* 3,5 mL/min

## 5.- MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE PELO

### 5.1.- Aparatos, Instrumentación Analítica y Reactivos

#### *Aparatos e Instrumentación Analítica*

Ver página 106. Las condiciones de medida para los metales en el espectrofotómetro de absorción atómica con llama se muestran en la Tabla XXVI (página 154).

#### *Reactivos*

Ver páginas 107 y 230.

### 5.2.- Procedimiento para la Determinación de Metales en Muestras de Pelo

El esquema de trabajo del método optimizado para la determinación de metales en muestras de pelo se basa en dos etapas:

1) En una primera etapa se realiza la lixiviación de la muestra de pelo (Figura 68). Para ello se inserta con cuidado y se pesa directamente en la minicolumna la muestra de pelo (< 1 cm, 5-125 mg) con la ayuda de unas pinzas de plástico. Posteriormente, se colocan dos papeles de filtro en los extremos de la columna para evitar pérdidas de muestra a través del sistema. Una vez preparada la minicolumna, se conecta en el sistema de flujo continuo, se llena el sistema de disolución lixivante por medio de la VS1 (2 mL de ácido nítrico 3 M o ácido nítrico 4 M en el caso del cromo), manteniendo la temperatura del baño a 80 °C para el Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni y Pb, y a 70 °C para el Zn durante todo el proceso. Después, se somete a la minicolumna a la acción de la energía de ultrasonidos durante 5 min para el Cr, 4 min para el Cd, Co y Ni, 3 min para Cu, Fe y Mn, y 2 min para el Pb y Zn, a la vez que circula a su través la disolución lixivante.

El sentido del movimiento del lixivante que circula a través de la columna a 3 mL/min se cambia cada 30 s para que no se produzcan compactaciones de la muestra en la minicolumna.

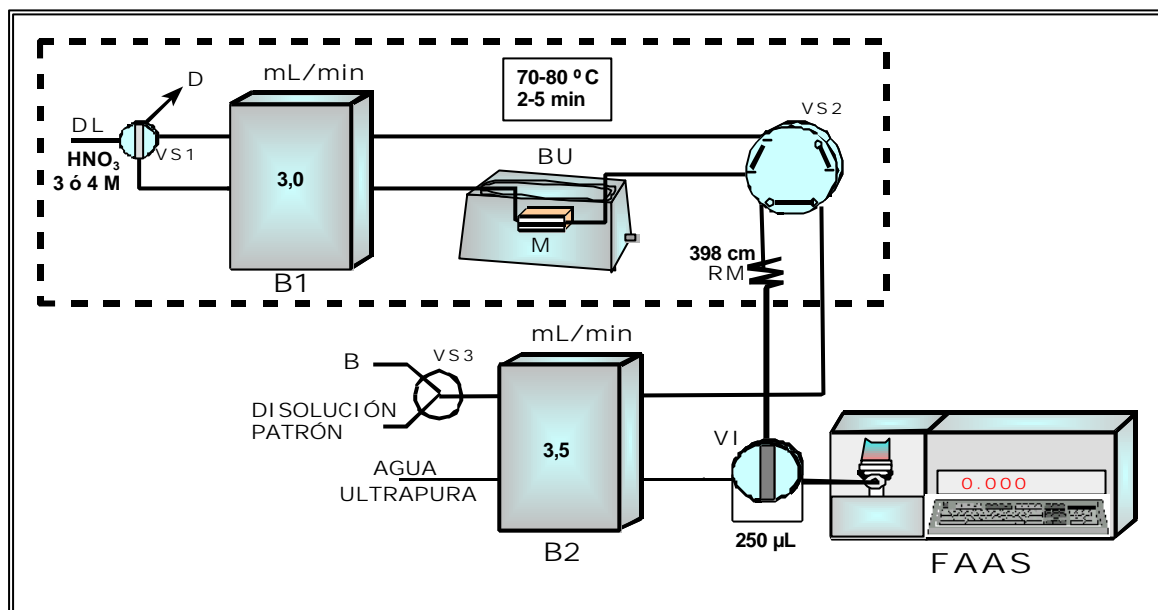


Figura 68.- Proceso de lixiviación continua y medida de la disolución blanco. B, blanco; BU, baño de ultrasonidos; B1 y B2, bombas peristálticas; D, desecho; DL, disolución lixiviante; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama; M, columna conteniendo la muestra (filtro); RM, reactor de mezcla; VI, válvula de inyección; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección

Si el objetivo fuera extraer todos los metales al mismo tiempo, la disolución lixiviante sería ácido nítrico 4 M, la temperatura de lixiviación 80 °C y el tiempo de sonicación 5 min.

2) Una vez realizada la lixiviación de la muestra, se gira la válvula de selección (VS2) pasando el lixiviado a la segunda parte del sistema, mientras que la disolución blanco va al desecho (Figura 69). En esta parte, el lixiviado se homogeneiza en un reactor de mezcla. Tras ser homogeneizado, se inyectan 250 µL de lixiviado en una corriente portadora (agua ultrapura) a través de una válvula de inyección (VI). Esta disolución portadora que circula a un caudal de 3,5 mL/min, transporta el bolo de muestra hasta el nebulizador de un espectrofotómetro de absorción atómica con llama (FAAS), donde se detectan los metales de forma continua según las condiciones de medida para cada metal en el espectrofotómetro de absorción atómica (Tabla XXVI).



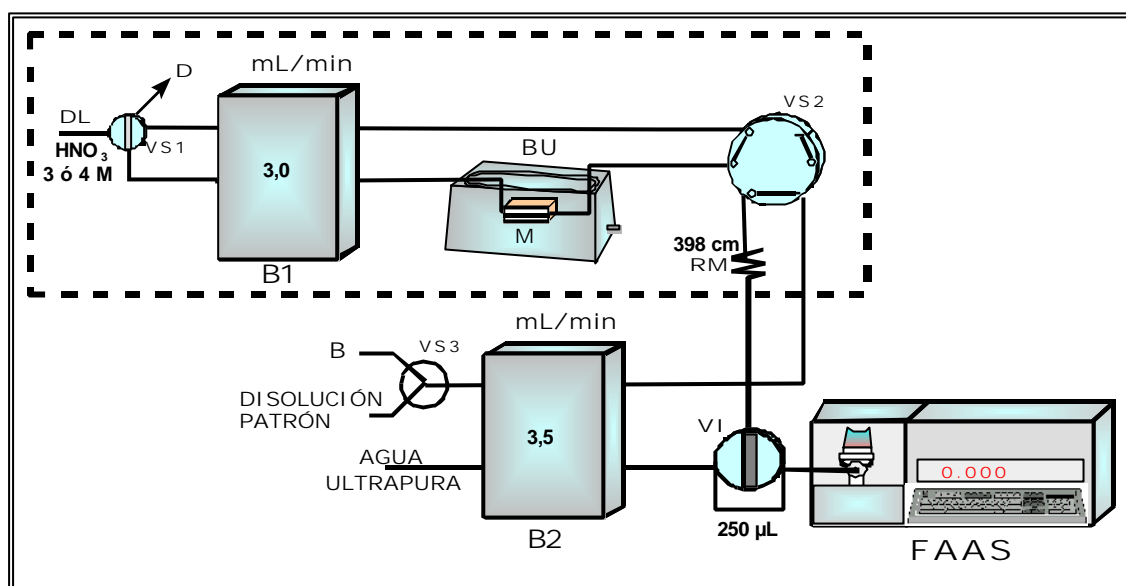


Figura 70.- Medida de las Disoluciones Patrón de los Distintos Metales. B, blanco; BU, baño de ultrasonidos; B1 y B2, bombas peristálticas; D, desecho; DL, disolución lixiviante; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama; M, columna conteniendo la muestra (filtro); RM, reactor de mezcla; VI, válvula de inyección; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección

## 6.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE PELO

Se evaluaron las características analíticas del método desarrollado para la determinación de metales en muestras de pelo de trabajadores expuestos a contaminación metálica (humos de soldadura), calculando los límites de detección y cuantificación, la sensibilidad, el intervalo lineal, la precisión y la exactitud. Además, se estudió el efecto matriz comparando las rectas de calibrado y adición, y se determinó la frecuencia de muestreo.

### 6.1. Rectas de Calibrado

Al ser el sistema FIA de extracción utilizado similar al empleado para la determinación de metales en humos de soldadura, las rectas de calibrado fueron las obtenidas previamente (p. 159-162, Tabla XXVII y Figuras 38 (I-IX))

### 6.2.- Límites de Detección y Límites de Cuantificación

El cálculo del LOD y LOQ se realizó en base a la determinación de 30 medidas de un blanco (disolución 4 M  $\text{HNO}_3$  para el Cr y 3 M para los demás metales), realizadas en las condiciones óptimas. Se calculó el valor de  $3\sigma$  para el LOD y  $10\sigma$  para el LOQ y se sustituyó cada valor en la recta de calibrado del método para cada metal. Estos valores también se refirieron a las distintas cantidades de muestra utilizadas (Tabla LXXVII).

Tabla LXXVII.- LOD y LOQ para la determinación de metales en muestras de pelo

	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )	Peso de Muestra (mg)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )
Cd	8,4	28,0	50	0,3	1,1
			100	0,2	0,6
			125	0,1	0,4
Co	41,4	138,0	50	1,7	5,5
			100	0,8	2,8
			125	0,7	2,3
Cr	23,5	78,4	50	0,9	3,1
			100	0,5	1,6
			125	0,4	1,3
Cu	20,7	69,0	25	1,7	5,5
			50	0,8	2,8
			100	0,4	1,3
Fe	26,7	88,9	10	5,3	17,8
			25	2,1	7,1
			50	1,1	3,6
Mn	16,9	56,3	50	0,7	2,3
			100	0,4	1,3
			125	0,3	1,1
Ni	38,7	129,0	50	1,6	5,2
			100	0,8	2,8
			125	0,6	2,1
Pb	64,5	215,1	50	2,6	8,6
			100	1,3	4,3
			125	1,0	3,4
Zn	5,2	17,3	5	2,1	7,1
			10	1,0	3,4



## 6.3.- Sensibilidad del Método Analítico

La sensibilidad según la IUPAC y los resultados expresados en función de la cantidad de muestra ( $\mu\text{g/g}$ ) se muestran en la Tabla LXXVIII. Además, se calculó la sensibilidad para un 1% de absorción, expresando cada valor en función de la cantidad de muestra se obtienen los resultados expresados en  $\mu\text{g/g}$ , los cuales también se presentan en la Tabla LXXVIII.

Tabla LXXVIII.- Sensibilidad en la determinación de metales en muestras de pelo

	Peso de Muestra (mg)	Sensibilidad ( $\mu\text{g/L}$ )	Sensibilidad ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidad 1 % absorción ( $\mu\text{g/g}$ )
Cd	50	144,0	5,8	1,2
	100		2,9	0,6
	125		2,3	0,5
Co	50	29,0	1,2	6,1
	100		0,6	3,0
	125		0,5	2,4
Cr	50	51,0	2,0	3,4
	100		1,0	1,7
	125		0,8	1,3
Cu	25	58,0	4,6	6,1
	50		2,3	3,0
	100		1,2	1,5
Fe	10	45,0	9,0	19,6
	25		3,6	7,9
	50		1,8	3,9
Mn	50	71,0	2,8	2,5
	100		1,4	1,2
	125		1,1	1,0
Ni	50	31,0	1,2	5,7
	100		0,6	2,8
	125		0,5	2,3
Pb	50	18,6	0,7	9,5
	100		0,4	4,7
	125		0,3	3,8
Zn	5	230,0	92,0	7,6
	10		46,0	3,8

#### 6.4.-Intervalo Lineal

Según las ecuaciones de las rectas, los límites de cuantificación obtenidos, la dispersión del sistema FIA (1,1) y conociendo que en espectroscopía de absorción atómica con llama los límites de linealidad para la determinación directa de los metales son los que se muestran en la Tabla XXVI (página 154), los intervalos lineales correspondientes a la determinación de cada metal se reflejan en la Tabla LXXIX. Los intervalos lineales se han expresado en función de la cantidad de muestra.

Tabla LXXIX.- Intervalos lineales en la determinación de metales en muestras de pelo

	Peso de Muestra (mg)	Intervalo Lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
Cd	50	1,1 – 88,0
	100	0,6 – 44,0
	125	0,4 – 35,2
Co	50	5,5 – 154,0
	100	2,8 – 77,0
	125	2,3 – 61,6
Cr	50	3,1 – 220,0
	100	1,6 – 110,0
	125	1,3 - 88,0
Cu	25	5,5 - 440,0
	50	2,8 - 220,0
	100	1,3 - 110,0
Fe	10	17,8 - 1100,0
	25	7,1 - 440,0
	50	3,6 - 220,0
Mn	50	2,3 - 88,0
	100	1,3 - 44,0
	125	1,1 - 35,2
Ni	50	5,2 - 88,0
	100	2,8 - 44,0
	125	2,1 - 35,2
Pb	50	8,6 - 880,0
	100	4,3 - 440,0
	125	3,4 - 352,0
Zn	5	7,1 - 440,0
	10	3,4 - 220,0

#### 6.5.-Estudio de la Precisión del Método

Para evaluar la precisión del método analítico se hizo un estudio de la repetibilidad del proceso global para la determinación de los metales en muestras de pelo. Para ello se midieron veintidós muestras reales (once de una muestra de pelo perteneciente a un trabajador expuesto a humos de soldadura y once de una muestra de pelo de una persona control (no expuesta a humos de soldadura). Estas muestras se analizaron con el sistema FIA propuesto, y en las condiciones óptimas. Para el Cd, Co, Cr, Mn y Pb se analizaron 125 mg de muestra porque si no la concentración medida de estos metales (en  $\mu\text{g/mL}$ ) estaría por debajo del límite de detección en la muestra de pelo control. En el caso del Ni se necesitarían 125 mg porque si no la concentración medida de este metal (en  $\mu\text{g/mL}$ ) en la muestra de pelo de un trabajador expuesto a humos de soldadura y en el pelo control estaría por debajo del límite de detección. Con los resultados obtenidos se calculó la desviación estándar, la media y el coeficiente de variación. Estos valores se muestran en la Tabla LXXX. En esta Tabla se puede observar que la precisión obtenida es aceptable para la determinación de metales en el pelo de trabajadores expuestos a humos de soldadura, ya que la muestra de pelo presenta una mayor concentración metálica que la que se obtiene para la muestra control.

En el caso de la concentración de Co en el pelo control, la concentración se encuentra por debajo del límite de detección, y para el cadmio, manganeso, níquel y plomo, las concentraciones encontradas en la muestra control se sitúan a niveles próximos a los límites de cuantificación del método, por eso los coeficientes de variación son los más altos (14,3; 9,1; 8,3 y 7,0%, respectivamente). Por lo demás, los restantes coeficientes de variación se encuentran por debajo del 5% para el pelo de un trabajador expuesto a humos de soldadura (concentración metálica mayor). De esta manera, se puede confirmar la precisión de la metodología analítica propuesta para la determinación de metales en pelo de trabajadores expuestos a humos de soldadura, y la obtención de resultados óptimos para la determinación de cromo, cobre, hierro y cinc en las muestras control.

Tabla LXXX.- Estudio de la precisión en la determinación de metales en muestras de pelo

	Peso de Muestra (mg)	Trabajador expuesto a humos de soldadura (media $\pm$ s) ( $\mu\text{g/g}$ )	CV (%)	Persona control (media $\pm$ s) ( $\mu\text{g/g}$ )	CV (%)
Cd	125	3,4 $\pm$ 0,1	2,9	0,7 $\pm$ 0,1	14,3
Co	125	4,3 $\pm$ 0,2	4,7	<sup>1</sup> N.D.	-
Cr	125	9,6 $\pm$ 0,2	2,1	1,5 $\pm$ 0,1	6,7
Cu	25	77,8 $\pm$ 0,7	0,9	34,1 $\pm$ 0,7	2,1
	50	77,7 $\pm$ 0,3	0,4	34,2 $\pm$ 0,4	1,2
	100	77,8 $\pm$ 0,3	0,4	34,4 $\pm$ 0,1	0,3
Fe	10	96,2 $\pm$ 2,3	2,4	29,9 $\pm$ 2,1	7,0
	25	96,3 $\pm$ 0,7	0,7	29,7 $\pm$ 0,8	2,7
	50	96,1 $\pm$ 0,5	0,5	29,7 $\pm$ 0,5	1,7
Mn	125	11,2 $\pm$ 0,2	1,8	1,1 $\pm$ 0,1	9,1
Ni	125	4,2 $\pm$ 0,2	4,8	2,4 $\pm$ 0,2	8,3
Pb	125	55,6 $\pm$ 0,4	0,7	5,7 $\pm$ 0,4	7,0
Zn	5	190,5 $\pm$ 1,4	0,7	80,5 $\pm$ 0,8	1,0
	10	190,3 $\pm$ 0,5	0,3	80,4 $\pm$ 0,7	0,9

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

#### 6.6.- Estudio de la Exactitud del Método

La comprobación de la exactitud de la metodología analítica propuesta se realizó de tres maneras: realizando el test de parejas (comparación con un método de referencia), estudio de la recuperación analítica y mediante la utilización de materiales de referencia.

##### 6.6.1. Comparación con el método de referencia

Este estudio se aplicó a una muestra de pelo (de un trabajador expuesto a humos de soldadura). Los metales en esta muestra se determinaron por un método de referencia (basado en una digestión ácida convencional utilizando ácidos concentrados, ver p. 232) y por el método propuesto. Con el fin de

establecer la exactitud del método propuesto se aplicó el test de parejas calculándose la media y la desviación estándar de las diferencias entre los resultados obtenidos por ambos métodos para cada uno de los metales (Tabla LXXXI).

Tabla LXXXI.- Determinación de metales en muestras de pelo: test de parejas

	Concentración, $\mu\text{g/g}$		Diferencia
	Método Propuesto	Método de Referencia	
Cd	3,4	3,4	0
Co	4,3	4,0	0,3
Cr	9,6	9,5	0,1
Cu	77,8	77,7	0,1
Fe	96,2	96,4	-0,2
Mn	11,2	11,1	0,1
Ni	4,2	4,1	0,1
Pb	55,6	55,3	0,3
Zn	190,4	190,6	-0,2

$$\bar{X}_d = 0,07$$

$$\sigma_d = 0,18$$

*Test de parejas:*

a)

Hipótesis nula:	$H_0 : \bar{X}_d = 0$
Hipótesis alternativa:	$H_1 : \bar{X}_d \neq 0$

b) Cálculo del valor de t experimental:  $t_{\text{exp}} = \frac{\bar{X}_d \sqrt{n}}{\sigma_d} = 1,1$

c) t tabulado para n-1 grados de libertad y 95% de probabilidad (test de dos colas):  $t_{\text{tabulado}} = 2,31$

- d) Como  $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabulado}}$  se acepta  $H_0$ , al nivel de significación elegido (95%). Por tanto, los valores obtenidos sobre diferentes muestras son comparables estadísticamente al nivel de significación elegido, es decir, no hay diferencias entre los resultados obtenidos por los dos métodos. Como un grupo de resultados se halló con el método de referencia, se puede decir que el otro (método propuesto) es estadísticamente comparable, y por tanto, exacto.

#### 6.6.2.- Recuperación del método

Para realizar este estudio se llevó a cabo el análisis de una muestra de pelo de un trabajador expuesto a humos de soldadura. El método de determinación de los metales en muestras de pelo se aplicó utilizando una disolución lixivante ( $\text{HNO}_3$ , 3 M para todos los metales, excepto para el Cr que fue 4 M) a la que se le habían adicionado distintas concentraciones de cada metal (ver Tabla LXXXII).

Tabla LXXXII.- Características de las disoluciones lixiviantes utilizadas para el estudio de la recuperación analítica

	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	5,0	0,25
Medio en que se prepararon las disoluciones	$\text{HNO}_3$ 3 M	$\text{HNO}_3$ 3 M	$\text{HNO}_3$ 4 M	$\text{HNO}_3$ 3 M	$\text{HNO}_3$ 3 M	$\text{HNO}_3$ 3 M	$\text{HNO}_3$ 3 M	$\text{HNO}_3$ 3 M	$\text{HNO}_3$ 3 M

Una vez obtenidos los datos de estos análisis se calculó el % de recuperación de la siguiente forma:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

Siendo:

A: [Metal] en la muestra + [Metal] añadida  
(valor calculado experimentalmente)

B: [Metal] en la muestra (valor calculado experimentalmente)

C: [Metal] añadida

Los resultados obtenidos para la recuperación analítica se reflejan en la Tabla XXXVIII.

Tabla LXXXIII.- Resultados del cálculo de la recuperación analítica

	% Recuperación Analítica
Cd	97,1
Co	102,3
Cr	97,9
Cu	99,2
Fe	95,3
Mn	99,1
Ni	102,4
Pb	99,1
Zn	96,6

A la vista de los resultados obtenidos, se observa que la recuperación de los metales, en todos los casos es cuantitativa, ya que el tanto por ciento de recuperación oscila entre 90,7-102,3 %.

#### 6.6.3.- Medida de Materiales de Referencia

Se analizaron dos materiales de referencia (elementos traza en pelo humano): NIES No. 13 (National Institute for Environmental Studies, Japan Environment Agency (Japón) y CRM 397 (Community Bureau of Reference, Bélgica). El contenido certificado, el valor informativo y/o indicativo para los metales en estos materiales de referencia se muestra en la Tabla LXXXIV (estos materiales sólo certifican la concentración de algunos metales). En esta Tabla también aparecen los resultados obtenidos para la determinación de estos metales en estos materiales de referencia por la metodología propuesta (media  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ).

Tabla LXXXI V.- Resultados de la medida de los materiales de referencia

		NIES No. 13		CRM 397	
	mg muestra	Concentración certificada (µg/g)	Concentración obtenida (µg/g)	Concentración certificada (µg/g)	Concentración obtenida (µg/g)
Cd	125	0,23 ± 0,03	<sup>3</sup> N.D.	0,521 ± 0,024	0,519 ± 0,064
Co	125	<sup>1</sup> 0,07	<sup>3</sup> N.D.	<sup>2</sup> 0,55 ± 0,03	<sup>3</sup> N.D.
Cr	50	-	-	<sup>2</sup> 91 ± 33	90,2 ± 0,8
Cu	25	15,3 ± 1,3	15,2 ± 1,3	<sup>1</sup> 110 ± 5	108,9 ± 1,4
Fe	10	<sup>1</sup> 140	140,7 ± 2,6	<sup>2</sup> 580 ± 10	580,7 ± 2,5
Mn	50	<sup>1</sup> 3,9	3,7 ± 0,3	<sup>2</sup> 11,2 ± 0,3	11,1 ± 0,3
Ni	50	-	-	<sup>1</sup> 46,0 ± 1,4	46,1 ± 0,8
Pb	100	4,6 ± 0,4	4,7 ± 0,5	33,0 ± 1,2	33,0 ± 0,6
Zn	5	172 ± 11	171,6 ± 1,0	199 ± 5	198,9 ± 1,0

<sup>1</sup> Valor indicativo<sup>2</sup> Valor informativo<sup>3</sup> N.D.: No detectado

Como se puede observar en la Tabla LXXXIV, los resultados obtenidos están dentro del intervalo certificado e indicativo, y son similares a los valores informativos.

Con todos estos datos se puede decir que el procedimiento utilizado para realizar la determinación de metales en pelo es exacto.



6.7.- Recta de Adición

Para comprobar si existe efecto matriz se utilizó la técnica de las adiciones estándar. Para ello se analizó una muestra de pelo de un trabajador expuesto a humos de soldadura. El método se aplicó utilizando una disolución lixivante (HNO<sub>3</sub>, 3 M para todos los metales, excepto para el Cr que fue 4 M) a la que se le habían adicionado varias concentraciones de cada metal. El intervalo de concentraciones adicionado para cada metal se muestra en la Tabla LXXXV.

Tabla LXXXV.- Características de las rectas de adición de los distintos metales

	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Intervalo de concentración de las adiciones (µg/mL)	0-1,5	0-2,5	0-2,5	0-2,5	0-2,5	0-1,0	0-1,0	0-15,0	0-0,5
Medio en que se prepararon las disoluciones	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 4 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M	HNO <sub>3</sub> 3 M
Cantidad de muestra (mg)	125	125	50	25	10	50	125	50	5

Con los resultados de absorbancia obtenidos se trazaron las rectas de adición para cada metal (Figuras 71 (I-IX)).

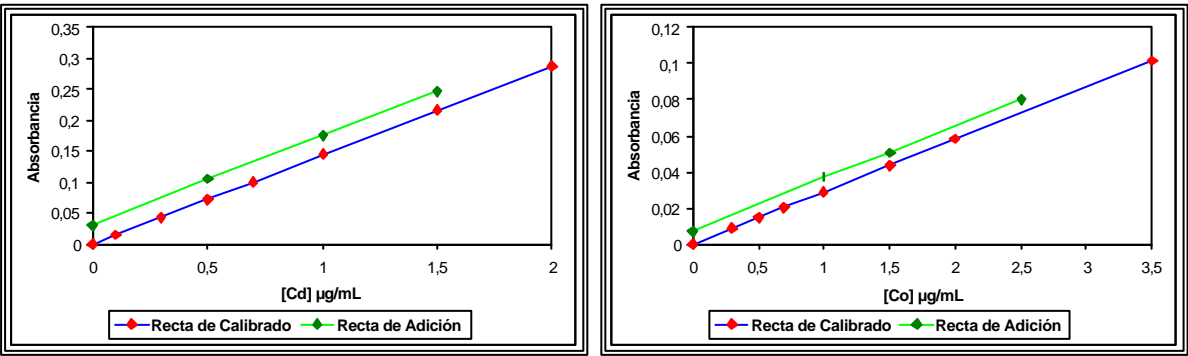


Figura 71 (I).- Cd: Recta de Adición

$$A = 0,143 \text{ (Cd, } \mu\text{g/mL)} + 0,032;$$
$$r = 0,999$$

Figura 71 (II).- Co: Recta de Adición

$$A = 0,029 \text{ (Co, } \mu\text{g/mL)} + 0,007;$$
$$r = 0,999$$

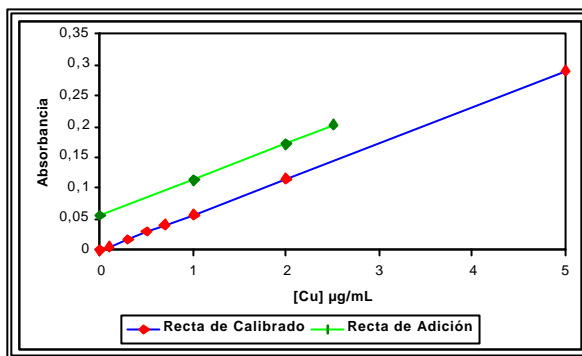
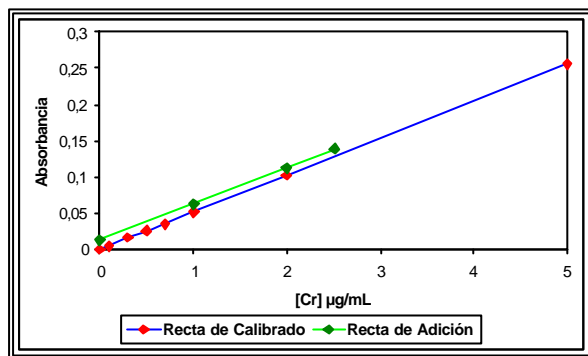


Figura 71 (III).- Cr: Recta de Adición      Figura 71(IV).- Cu: Recta de Adición

$$A = 0,051 (\text{Cr}, \mu\text{g/mL}) + 0,012;$$

$$r = 0,999$$

$$A = 0,058 (\text{Cu}, \mu\text{g/mL}) + 0,056;$$

$$r = 0,999$$

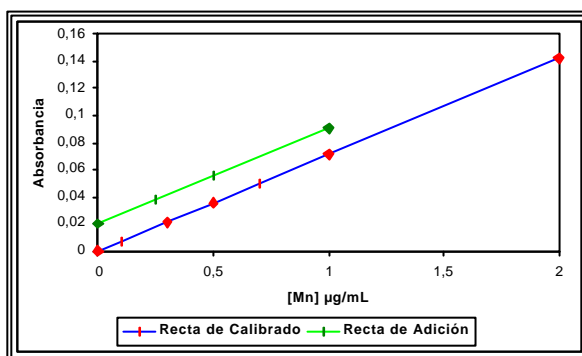
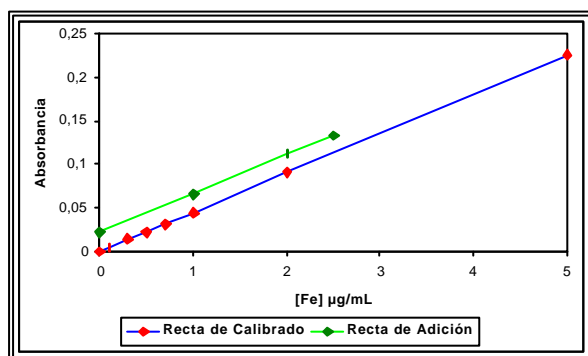


Figura 71 (V).- Fe: Recta de Adición

Figura 71(VI).- Mn: Recta de

$$A = 0,045 (\text{Fe}, \mu\text{g/mL}) + 0,022;$$

$$r = 0,999$$

$$A = 0,071 (\text{Mn}, \mu\text{g/mL}) + 0,020;$$

$$r = 0,999$$

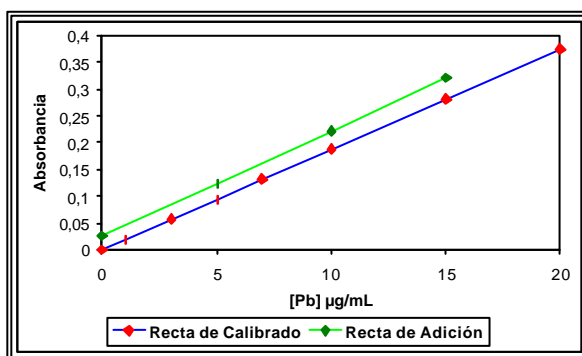
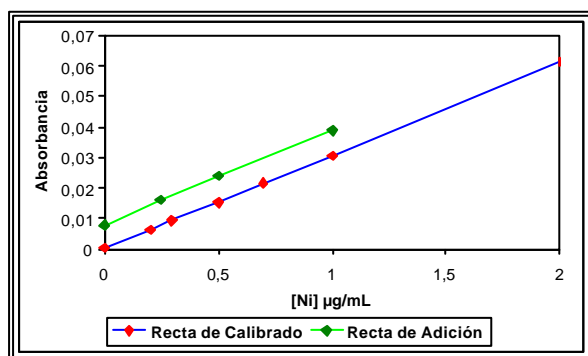


Figura 71(VII).- Ni: Recta de Adición

Figura 71(VIII).-Pb:Recta de Adición

$$A = 0,031 (\text{Ni}, \mu\text{g/mL}) + 0,008;$$

$$r = 0,999$$

$$A = 0,019 (\text{Pb}, \mu\text{g/mL}) + 0,025;$$

$$r = 0,999$$

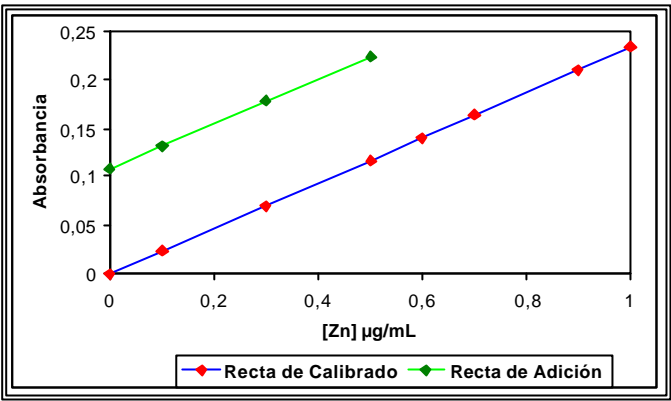


Figura 71 (IX).- Zn: Recta de Adición

$A = 0,230 \text{ (Zn, } \mu\text{g/mL)} + 0,109;$   
 $r = 0,999$

En las Figuras 71 (I-IX), se observa que ambas rectas (calibrado y adición) son totalmente paralelas. Este paralelismo entre ambas rectas se comprueba estadísticamente (test t, nivel de confianza 95%) mediante el programa ULC (Univariate Linear Calibration) [208]. Por tanto, no tiene lugar ningún efecto matriz. Así, se puede calcular la concentración de los metales directamente en las muestras utilizando la recta de calibrado.

6.8.- Frecuencia de Muestreo

Se calculó la frecuencia de muestreo del método propuesto. Considerando la duración de la etapa de lixiviación y la duración de la etapa de medida (20 s). De esta manera, las frecuencias de muestreo para los distintos metales se reflejan en la Tabla LXXXVI.

Tabla LXXXVI .- Frecuencia de muestreo para la determinación de metales en muestras de pelo

	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Frecuencia de muestreo (muestras/h)	14	14	11	18	18	18	14	25	25

## 7.- APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE PELO

Con el objetivo de aplicar las metodologías propuestas a muestras reales se midieron muestras de pelo perteneciente a trabajadores expuestos a humos de soldadura y muestras de pelo control (de personas no expuestas a humos de soldadura). Estas muestras se analizaron por triplicado con el sistema FIA propuesto, y en las condiciones óptimas.

Los resultados obtenidos para el pelo de trabajadores expuestos a humos de soldadura se muestran en la Tablas LXXXVII (1-9) y los obtenidos para el pelo control en las Tablas LXXXVIII (1-9).

Tabla LXXXVII (1).- Concentración de cadmio en muestras de pelo de trabajadores expuestos a humos de soldadura

	Puesto de Trabajo	Edad	Antigüedad en la Profesión	Peso de Muestra Analizado (mg)	[Cd] en pelo (media $\pm$ <b>s</b> ) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	Soldador	18	4 meses	125	0,5 $\pm$ 0,0
Muestra 2	Soldador	25	5 años	125	1,2 $\pm$ 0,1
Muestra 3	Soldador	41	22 años	125	3,4 $\pm$ 0,1
Muestra 4	Soldador	56	38 años	125	4,9 $\pm$ 0,1
Muestra 5	Mecánico	45	24 años	125	N.D.
Muestra 6	Electricista	51	32 años	125	N.D.
Muestra 7	Personal técnico	29	4 años	125	N.D.

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla LXXXVII (2).- Concentración de cobalto en muestras de pelo de trabajadores expuestos a humos de soldadura

	Puesto de Trabajo	Edad	Antigüedad en la Profesión	Peso de Muestra Analizado (mg)	[Co] en pelo (media $\pm$ s) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	Soldador	18	4 meses	125	N.D.
Muestra 2	Soldador	25	5 años	125	N.D.
Muestra 3	Soldador	41	22 años	125	2,4 $\pm$ 0,0
Muestra 4	Soldador	56	38 años	125	4,3 $\pm$ 0,2
Muestra 5	Mecánico	45	24 años	125	N.D.
Muestra 6	Electricista	51	32 años	125	N.D.
Muestra 7	Personal técnico	29	4 años	125	N.D.

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla LXXXVII (3).- Concentración de cromo en muestras de pelo de trabajadores expuestos a humos de soldadura

	Puesto de Trabajo	Edad	Antigüedad en la Profesión	Peso de Muestra Analizado (mg)	[Cr] en pelo (media $\pm$ s) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	Soldador	18	4 meses	125	2,1 $\pm$ 0,0
Muestra 2	Soldador	25	5 años	125	4,5 $\pm$ 0,2
Muestra 3	Soldador	41	22 años	125	4,9 $\pm$ 0,2
Muestra 4	Soldador	56	38 años	125	9,6 $\pm$ 0,2
Muestra 5	Mecánico	45	24 años	125	1,5 $\pm$ 0,2
Muestra 6	Electricista	51	32 años	125	N.D.
Muestra 7	Personal técnico	29	4 años	125	N.D.

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla LXXXVII (4).- Concentración de cobre en muestras de pelo de trabajadores expuestos a humos de soldadura

	Puesto de Trabajo	Edad	Antigüedad en la Profesión	Peso de Muestra Analizado (mg)	[Cu] en pelo (media $\pm$ s) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	Soldador	18	4 meses	25	19,8 $\pm$ 0,8
Muestra 2	Soldador	25	5 años	25	51,9 $\pm$ 0,0
Muestra 3	Soldador	41	22 años	25	61,2 $\pm$ 0,8
Muestra 4	Soldador	56	38 años	25	77,8 $\pm$ 0,7
Muestra 5	Mecánico	45	24 años	25	35,0 $\pm$ 0,8
Muestra 6	Electricista	51	32 años	25	42,3 $\pm$ 0,8
Muestra 7	Personal técnico	29	4 años	25	22,9 $\pm$ 0,7

Tabla LXXXVII (5).- Concentración de hierro en muestras de pelo de trabajadores expuestos a humos de soldadura

	Puesto de Trabajo	Edad	Antigüedad en la Profesión	Peso de Muestra Analizado (mg)	[Fe] en pelo (media $\pm$ s) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	Soldador	18	4 meses	10	42,9 $\pm$ 0,0
Muestra 2	Soldador	25	5 años	10	96,2 $\pm$ 2,5
Muestra 3	Soldador	41	22 años	10	112,6 $\pm$ 2,6
Muestra 4	Soldador	56	38 años	10	268,2 $\pm$ 2,5
Muestra 5	Mecánico	45	24 años	10	51,8 $\pm$ 2,5
Muestra 6	Electricista	51	32 años	10	56,3 $\pm$ 2,6
Muestra 7	Personal técnico	29	4 años	10	37,1 $\pm$ 2,5

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla LXXXVII (6).- Concentración de manganeso en muestras de pelo de trabajadores expuestos a humos de soldadura

	Puesto de Trabajo	Edad	Antigüedad en la Profesión	Peso de Muestra Analizado (mg)	[Mn] en pelo (media $\pm$ s) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	Soldador	18	4 meses	125	6,0 $\pm$ 0,1
Muestra 2	Soldador	25	5 años	125	11,2 $\pm$ 0,1
Muestra 3	Soldador	41	22 años	125	22,6 $\pm$ 0,2
Muestra 4	Soldador	56	38 años	125	31,9 $\pm$ 0,1
Muestra 5	Mecánico	45	24 años	125	8,2 $\pm$ 0,1
Muestra 6	Electricista	51	32 años	125	10,5 $\pm$ 0,1
Muestra 7	Personal técnico	29	4 años	125	5,1 $\pm$ 0,1

Tabla LXXXVII (7).- Concentración de níquel en muestras de pelo de trabajadores expuestos a humos de soldadura

	Puesto de Trabajo	Edad	Antigüedad en la Profesión	Peso de Muestra Analizado (mg)	[Ni] en pelo (media $\pm$ s) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	Soldador	18	4 meses	125	N.D.
Muestra 2	Soldador	25	5 años	125	2,6 $\pm$ 0,0
Muestra 3	Soldador	41	22 años	125	3,3 $\pm$ 0,3
Muestra 4	Soldador	56	38 años	125	4,2 $\pm$ 0,2
Muestra 5	Mecánico	45	24 años	125	2,4 $\pm$ 0,3
Muestra 6	Electricista	51	32 años	125	2,9 $\pm$ 0,3
Muestra 7	Personal técnico	29	4 años	125	N.D.

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla LXXXVII (8).- Concentración de plomo en muestras de pelo de trabajadores expuestos a humos de soldadura

	Puesto de Trabajo	Edad	Antigüedad en la Profesión	Peso de Muestra Analizado (mg)	[Pb] en pelo (media $\pm$ <b>s</b> ) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	Soldador	18	4 meses	125	10,6 $\pm$ 0,5
Muestra 2	Soldador	25	5 años	125	36,4 $\pm$ 0,5
Muestra 3	Soldador	41	22 años	125	55,6 $\pm$ 0,4
Muestra 4	Soldador	56	38 años	125	71,7 $\pm$ 0,5
Muestra 5	Mecánico	45	24 años	125	96,2 $\pm$ 2,3
Muestra 6	Electricista	51	32 años	125	20,9 $\pm$ 0,5
Muestra 7	Personal técnico	29	4 años	125	3,7 $\pm$ 0,4

Tabla LXXXVII (9).- Concentración de cinc en muestras de pelo de trabajadores expuestos a humos de soldadura

	Puesto de Trabajo	Edad	Antigüedad en la Profesión	Peso de Muestra Analizado (mg)	[Zn] en pelo (media $\pm$ <b>s</b> ) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	Soldador	18	4 meses	5	108,4 $\pm$ 1,0
Muestra 2	Soldador	25	5 años	5	122,9 $\pm$ 1,0
Muestra 3	Soldador	41	22 años	5	190,5 $\pm$ 1,1
Muestra 4	Soldador	56	38 años	5	230,7 $\pm$ 1,0
Muestra 5	Mecánico	45	24 años	5	89,3 $\pm$ 1,0
Muestra 6	Electricista	51	32 años	5	96,8 $\pm$ 1,0
Muestra 7	Personal técnico	29	4 años	5	70,2 $\pm$ 1,0



Tabla LXXXVIII (1).- Concentración de cadmio en muestras de pelo control

	Edad	Peso de Muestra Analizado (mg)	Persona control [Cd] en pelo (media $\pm$ <b>s</b> ) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	8	125	N.D.
Muestra 2	18	125	N.D.
Muestra 3	24	125	N.D.
Muestra 4	35	125	N.D.
Muestra 5	37	125	N.D.
Muestra 6	41	125	N.D.
Muestra 7	55	125	0,7 $\pm$ 0,1

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla LXXXVIII (2).- Concentración de cobalto en muestras de pelo control

	Edad	Peso de Muestra Analizado (mg)	Persona control [Co] en pelo (media $\pm$ <b>s</b> ) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	8	125	N.D.
Muestra 2	18	125	N.D.
Muestra 3	24	125	N.D.
Muestra 4	35	125	N.D.
Muestra 5	37	125	N.D.
Muestra 6	41	125	N.D.
Muestra 7	55	125	N.D.

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla LXXXVIII (3).- Concentración de cromo en muestras de pelo control

	Edad	Peso de Muestra Analizado (mg)	Persona control [Cr] en pelo (media $\pm$ <b>s</b> ) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	8	125	N.D.
Muestra 2	18	125	N.D.
Muestra 3	24	125	N.D.
Muestra 4	35	125	N.D.
Muestra 5	37	125	N.D.
Muestra 6	41	125	1,4 $\pm$ 0,0
Muestra 7	55	125	1,5 $\pm$ 0,1

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla LXXXVIII (4).- Concentración de cobre en muestras de pelo control

	Edad	Peso de Muestra Analizado (mg)	Persona control [Cu] en pelo (media $\pm$ <b>s</b> ) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	8	25	7,4 $\pm$ 0,8
Muestra 2	18	25	7,8 $\pm$ 0,8
Muestra 3	24	25	10,1 $\pm$ 0,7
Muestra 4	35	25	12,9 $\pm$ 0,8
Muestra 5	37	25	21,2 $\pm$ 0,8
Muestra 6	41	25	28,6 $\pm$ 0,0
Muestra 7	55	25	34,2 $\pm$ 0,4

Tabla LXXXVIII (5).- Concentración de hierro en muestras de pelo control

	Edad	Peso de Muestra Analizado (mg)	Persona control [Fe] en pelo (media $\pm$ <b>s</b> ) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	8	10	20,7 $\pm$ 2,5
Muestra 2	18	10	29,7 $\pm$ 2,5
Muestra 3	24	10	38,5 $\pm$ 2,5
Muestra 4	35	10	40,3 $\pm$ 2,4
Muestra 5	37	10	41,8 $\pm$ 2,3
Muestra 6	41	10	44,4 $\pm$ 0,0
Muestra 7	55	10	46,7 $\pm$ 2,4

Tabla LXXXVIII (6).- Concentración de manganeso en muestras de pelo control

	Edad	Peso de Muestra Analizado (mg)	Persona control [Mn] en pelo (media $\pm$ <b>s</b> ) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	8	125	N.D.
Muestra 2	18	125	1,1 $\pm$ 0,1
Muestra 3	24	125	2,5 $\pm$ 0,2
Muestra 4	35	125	2,9 $\pm$ 0,0
Muestra 5	37	125	5,3 $\pm$ 0,1
Muestra 6	41	125	6,2 $\pm$ 0,1
Muestra 7	55	125	6,8 $\pm$ 0,1

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla LXXXVIII (7).- Concentración de níquel en muestras de pelo control

	Edad	Peso de Muestra Analizado (mg)	Persona control [Ni] en pelo (media $\pm$ s) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	8	125	N.D.
Muestra 2	18	125	N.D.
Muestra 3	24	125	N.D.
Muestra 4	35	125	N.D.
Muestra 5	37	125	N.D.
Muestra 6	41	125	N.D.
Muestra 7	55	125	2,4 $\pm$ 0,2

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla LXXXVIII (8).- Concentración de plomo en muestras de pelo control

	Edad	Peso de Muestra Analizado (mg)	Persona control [Pb] en pelo (media $\pm$ s) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	8	125	N.D.
Muestra 2	18	125	N.D.
Muestra 3	24	125	4,3 $\pm$ 0,0
Muestra 4	35	125	5,7 $\pm$ 0,4
Muestra 5	37	125	6,5 $\pm$ 0,5
Muestra 6	41	125	6,5 $\pm$ 0,5
Muestra 7	55	125	7,2 $\pm$ 0,5

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla LXXXVIII (9).- Concentración de cinc en muestras de pelo control

	Edad	Peso de Muestra Analizado (mg)	Persona control [Zn] en pelo (media $\pm$ s) ( $\mu\text{g/g}$ )
Muestra 1	8	5	22,0 $\pm$ 1,1
Muestra 2	18	5	44,6 $\pm$ 1,0
Muestra 3	24	5	67,2 $\pm$ 1,0
Muestra 4	35	5	75,4 $\pm$ 1,0
Muestra 5	37	5	79,4 $\pm$ 1,0
Muestra 6	41	5	80,5 $\pm$ 0,8
Muestra 7	55	5	86,4 $\pm$ 1,0

Como se puede observar en las Tablas LXXXVII y LXXXVIII y en las Figuras 72 (I-IX), la concentración metálica en las muestras de pelo analizadas es mayor para aquellas muestras pertenecientes a trabajadores expuestos a humos de soldadura. Sobre todo, para el pelo de los trabajadores directamente expuestos (soldadores). Sin embargo, solamente para el cromo, cobalto y el manganeso en alguna muestra la concentración encontrada supera el valor considerado como normal para el pelo de personas no directamente expuestas a humos metálicos (Tabla VII, p.53).

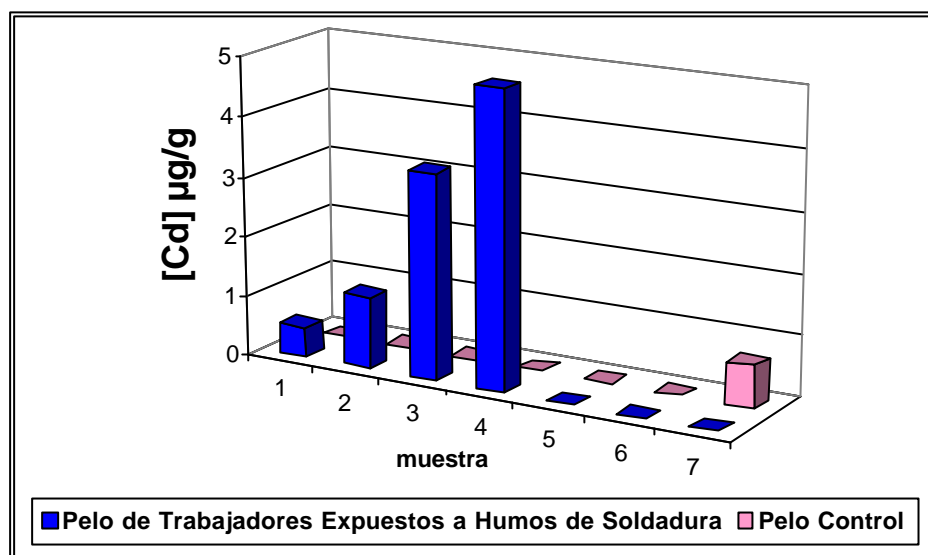


Figura 72 (I).- Resultados Cd en pelo

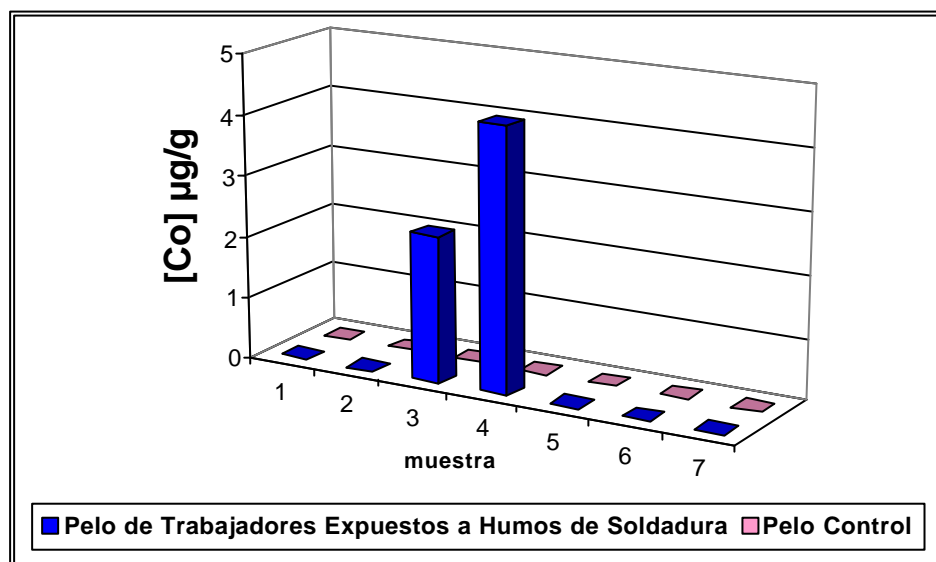


Figura 72 (II).- Resultados Co en pelo

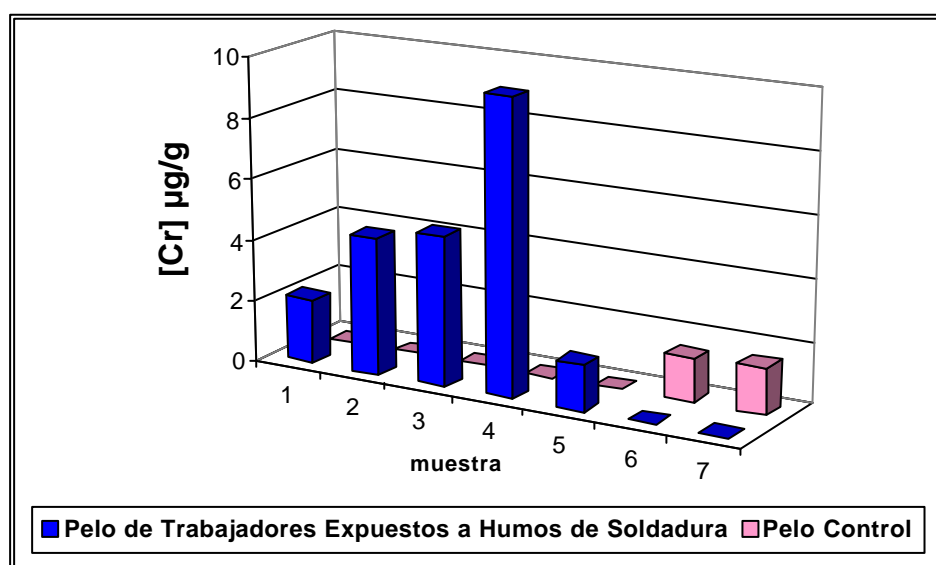


Figura 72 (III).- Resultados Cr en pelo

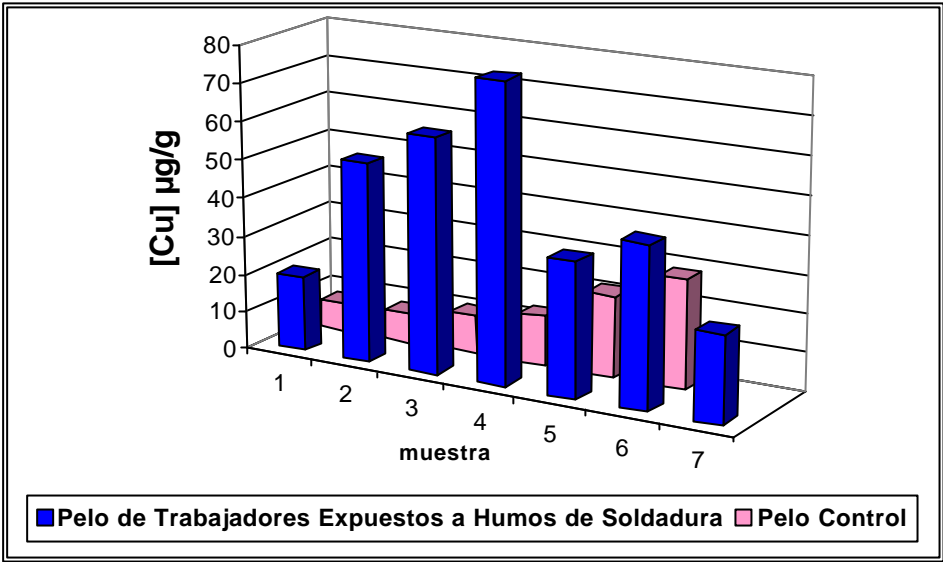


Figura 72 (IV).- Resultados Cu en pelo

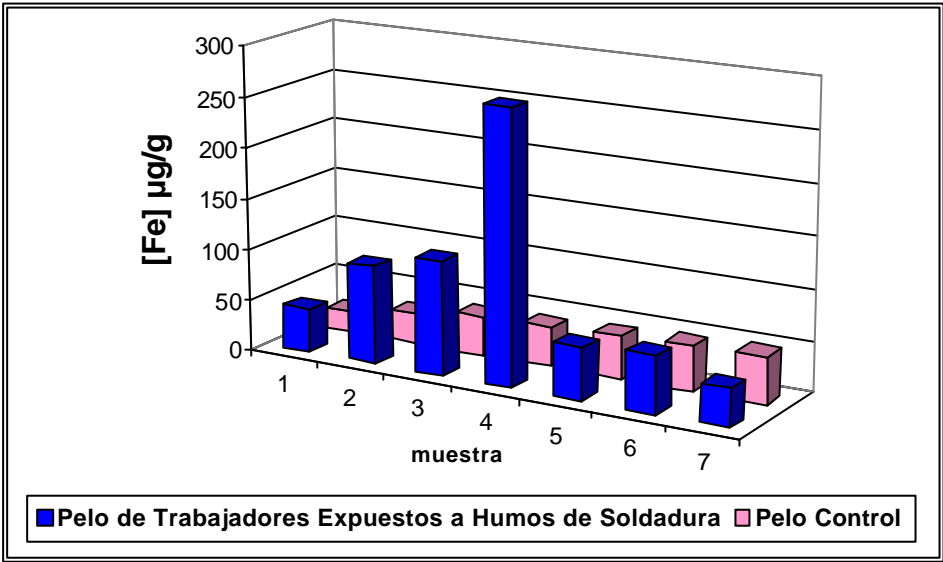


Figura 72 (V).- Resultados Fe en pelo

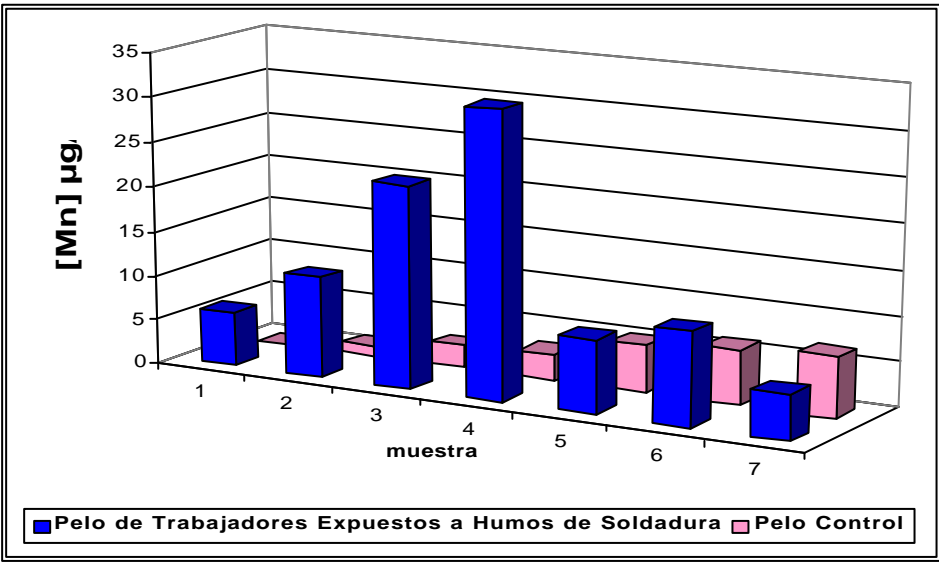


Figura 72 (VI).- Resultados Mn en pelo

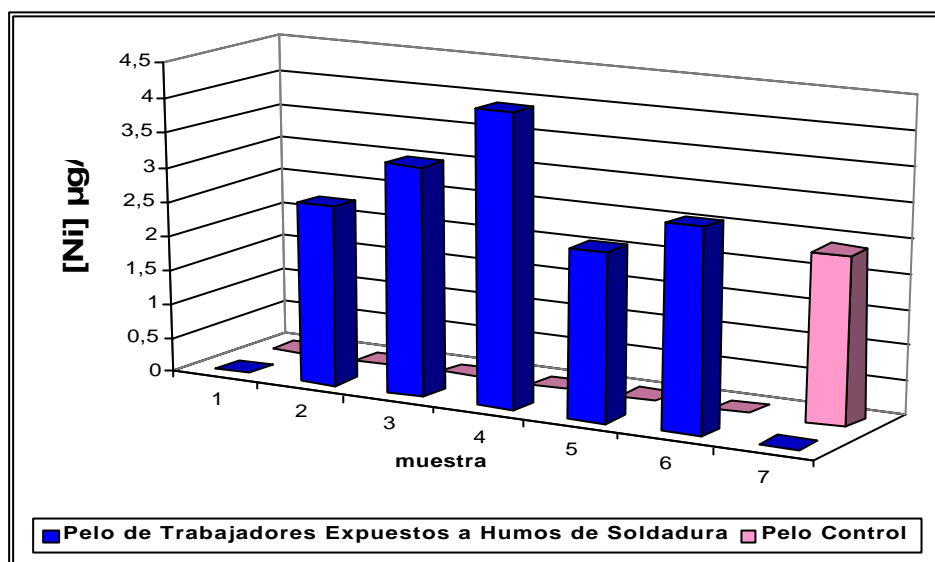


Figura 72 (VII).- Resultados Ni en pelo

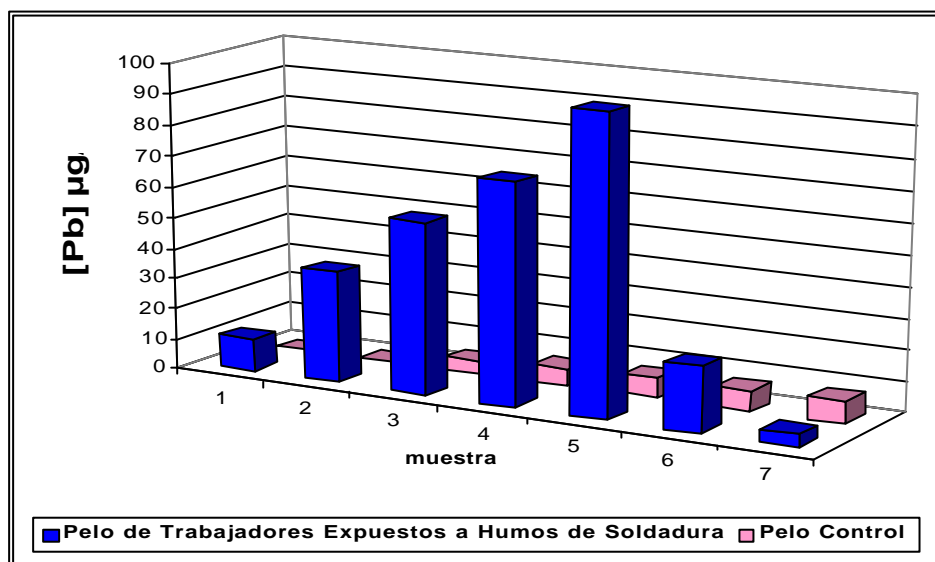


Figura 72 (VIII).- Resultados Pb en pelo

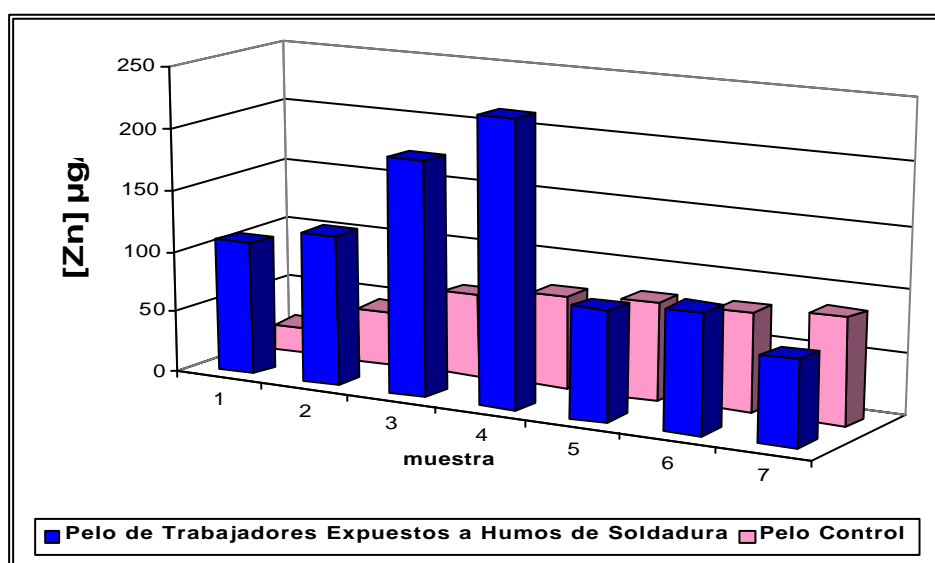


Figura 72 (IX).- Resultados Zn en pelo





**Capítulo VI.-**  
***Parte Experimental 4:***  
***Determinación de Metales en Orina***



## 1.- MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE ORINA

Las muestras de orina se obtuvieron de trabajadores expuestos a humos de soldadura y de personas no expuestas (muestras control). La orina fue recogida directamente en un frasco de polietileno, según las recomendaciones citadas anteriormente en la página 66.

En el caso de las muestras de orina pertenecientes a trabajadores expuestos a humos de soldadura, la muestra se obtuvo al final de la jornada del último día de la semana de trabajo (después de 4 o 5 días consecutivos de trabajo con exposición a contaminantes) y preferentemente en las dos últimas horas de la última jornada [153, 217-218].

Las muestras de orina se consideran complicadas de analizar debido a que tienen un elevado contenido salino y en péptidos, y una baja concentración metálica. Por tanto, en las determinaciones directas de metales por espectrometría de absorción atómica (con atomización electrotérmica o cuando sea posible con llama) estos inconvenientes se solucionan diluyendo la muestra con agua [219], Triton X-100 [220], ácido nítrico [221] o con una mezcla ácido nítrico/Triton X-100 [222].

Con el objetivo de eliminar las interferencias de la matriz de la muestra e incrementar la sensibilidad de la espectrometría de absorción atómica con llama, se suele incorporar a la metodología analítica una técnica de separación haciendo uso de una minicolumna conteniendo una resina formadora de quelatos. Así, se han utilizado mayoritariamente resinas con grupos iminodiacético, las cuales también han sido usadas para preconcentrar metales en otras muestras con alto contenido salino como son las de agua de mar, ya que presentan alta selectividad por cationes di y trivalentes, y no retienen a elementos alcalinos y alcalinotérreos [223-225]. Por este motivo, en este trabajo se ha elegido la resina Chelite Che (grupos iminodiacético) para realizar la preconcentración de los metales en las muestras de orina. Esta resina se comercializa con un tamaño de partícula entre 25-50 mesh, aunque para este trabajo se selecciona el tamaño de partícula más pequeño (25 mesh), ya que así se favorece el proceso de preconcentración [213-214].

Cuando se utiliza como método de preconcentración una resina formadora de quelatos, los inconvenientes citados anteriormente debidos a la matriz de la muestra también se solucionan realizando una digestión en medio ácido nítrico (con y sin peróxido de hidrógeno) [226]. Al mismo tiempo, este proceso evita la precipitación de los metales y asegura que éstos se encuentren libres para que puedan ser retenidos en la resina quelatante. Esto es importante porque los metales pueden formar complejos con una amplia gama de compuestos orgánicos que contiene la muestra, lo que evitaría que se encuentren libres para formar complejos con los grupos activos de la resina formadora de quelatos, y por tanto, impediría que fueran retenidos en la misma.

Por tanto, el desarrollo de metodologías analíticas automáticas para realizar la determinación de metales en muestras de orina por espectrometría de absorción atómica con llama implica realizar en línea el proceso de digestión de la muestra, la preconcentración y la detección de los metales.

Con el objeto de determinar si era posible realizar la determinación directa (sin preconcentración) de alguno de los metales estudiados se realizó un estudio preliminar. En este estudio se concluyó que tanto en el caso de orina procedente de trabajadores expuestos a contaminación metálica (humos de soldadura), como en orina control, después de realizar la digestión de la muestra de orina fuera de línea con ácido nítrico concentrado y la medida discontinua de los metales por FAAS [227], sólo es posible la determinación directa de cinc. Por este motivo, antes de optimizar el proceso de digestión en línea de la muestra se procedió primero a optimizar el proceso de preconcentración para Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni y Pb en muestras de orina.

## 2.- OPTIMIZACIÓN DE LA PRECONCENTRACIÓN ON-LINE DE LOS METALES: DISEÑOS EXPERIMENTALES

Preparación de la minicolumna: La minicolumna conteniendo la resina quelatante Chelite Che (grupos iminodiacético, Na<sup>+</sup>, Serdolit) se prepara realizando una suspensión de la resina (50 mg, 25 mesh) en agua. La resina

se inserta en la minicolumna (tubo de Tygon de 1,1 mm d.i.) con ayuda de una jeringa a la que previamente se le ha añadido lana de vidrio en uno de sus extremos. Una vez que se ha empaquetado con la resina, se sella también el otro extremo con lana de vidrio para que la resina quede retenida dentro de la minicolumna. En estas condiciones, las dimensiones de la minicolumna son 100 x 1,1 mm d.i. (Figura 73).

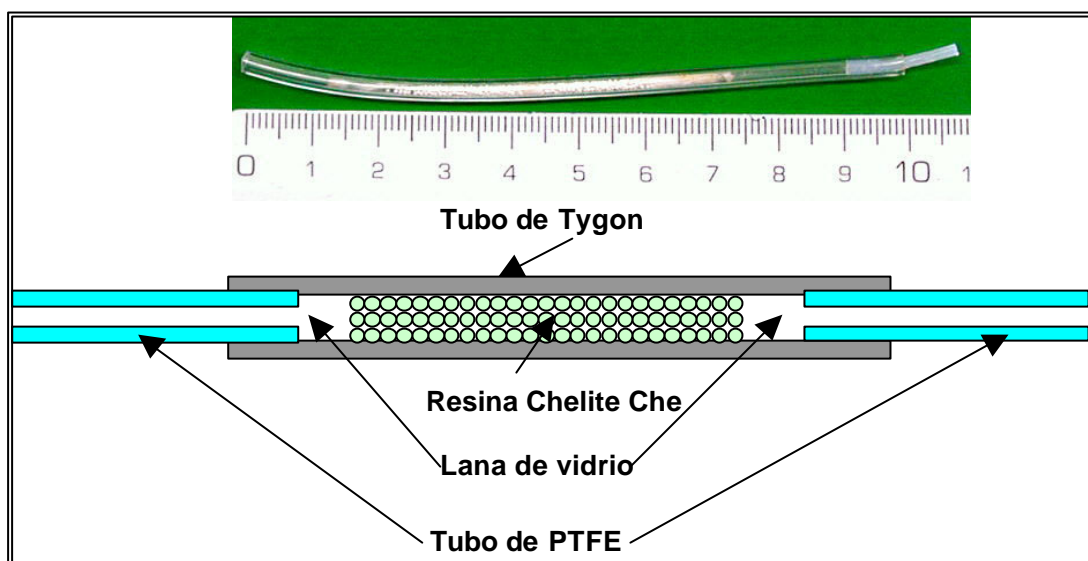


Figura 73.- Diseño de la minicolumna conteniendo la resina Chelate Che

Esta minicolumna se inserta en un sistema FIA de preconcentración (Figura 74). En este sencillo dispositivo se inserta en el canal principal del sistema FIA. En este sistema la matriz de la muestra no llega al detector (va al desecho) y durante la etapa de carga de la resina, lo que llega al detector es agua ultrapura. El sistema FIA incorpora un canal con una disolución reguladora debido a que después del proceso de digestión, la muestra de orina se encontrará en un medio muy ácido, y normalmente las resinas quelatantes no retienen cationes a valores de pH muy bajos. Como disolución reguladora se ha elegido una disolución de acetato amónico (Merck), la cual debe ser lo suficientemente concentrada para ajustar las muestras de orina (ya digeridas y en medio ácido) al pH adecuado de retención en la resina.

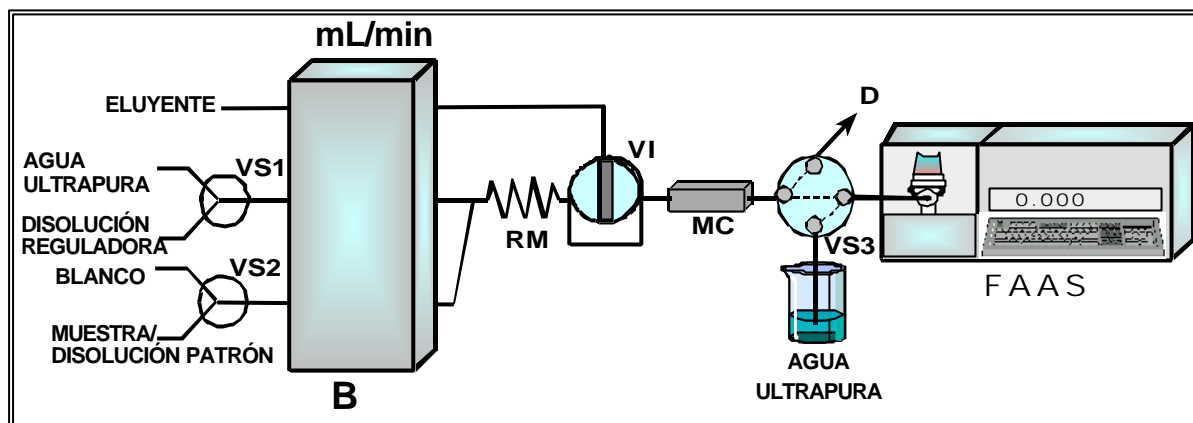


Figura 74.- Dispositivo FIA de preconcentración de la muestra de orina. B, bomba peristáltica; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección para inyectar el eluyente en el sistema; MC, minicolumna; RM, reactor de mezcla; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama

### 2.1. Diseño de Screening

Las variables implicadas en el proceso de preconcentración realizado con un dispositivo FIA como el reflejado en la Figura 74 que se optimizaron fueron siete:

- ❖ Concentración de acetato amónico
- ❖ Caudal de la disolución de acetato amónico
- ❖ Caudal de muestreo
- ❖ Longitud del reactor de mezcla
- ❖ Volumen de eluyente (HCl)
- ❖ Concentración de eluyente (HCl)
- ❖ Caudal de elución (caudal del agua ultrapura)

Los valores máximos y mínimos para estas variables fueron seleccionados en función de experimentos realizados en estudios previos (Tabla LXXXIX).

Tabla LXXXIX.- Preconcentración de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni y Pb:  
Variables y niveles considerados para el diseño factorial de screening

VARIABLE	CLAVE	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
Concentración de acetato amónico (AA)	A	0 M	12 M
Caudal de la disolución de AA	B	0,5 mL/min	2 mL/min
Caudal de muestreo	C	0,5 mL/min	4 mL/min
Longitud del reactor de mezcla	D	100 cm	300 cm
Volumen de eluyente (HCl)	E	90 µL	190 µL
Concentración de eluyente (HCl)	F	0,1 M	3 M
Caudal de elución (caudal del agua ultrapura)	G	2 mL/min	4 mL/min

El diseño factorial aplicado es el de Plackett-Burman  $2^{7*3/32}$  que implica realizar 13 experimentos que fueron aleatorizados para evitar errores de sistema (Statgraphics Plus v.5.1). En este diseño se ha considerado un punto central en el que las variables toman un valor medio entre el límite superior e inferior.

- Tipo de Diseño: Screening
- Nombre del Diseño: Plackett-Burman ( $2^{7*3/32}$ )
- Número de factores experimentales: 7
- Número de respuestas: 1
- Número de experimentos: 13
- Puntos centrales: 1
- Error grados de libertad: 5
- Aleatorio: Si

Una vez obtenida esta matriz, se realizaron los experimentos fijados por la misma. El diseño factorial se aplicó a 1 mL de una disolución sintética de orina preparada en ácido nítrico 5 M. Esta disolución sintética se preparó disolviendo en 100 mL de agua ultrapura 6,3 g de NaCl, 1,4 g de KCl, 1,0 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,9 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0,3 g de  $\text{CaCl}_2$ , 0,4 g de  $\text{MgCl}_2$ , 31 mmol urea y 4,9 mmol creatinina [157]. A esta disolución se le adicionaron diferentes cantidades de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni y Pb para que resultase una concentración final de 25, 70, 60, 60, 70, 60, 90 y 120  $\mu\text{g/L}$  de cada uno de estos metales, respectivamente y se le adicionó ácido nítrico, de manera que después de llevarla a 1 L presentase una concentración 5 M en ácido nítrico. La variable respuesta (% Recuperación) se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{A}{B} \times 100$$

Siendo:

A: concentración de metal obtenida experimentalmente

B: concentración de metal pasada por la resina

Los % de Recuperación obtenidos por triplicado y expresados como la media de los valores calculados obtenidos para cada experimento del diseño se muestran en la Tabla XC.



Tabla XC (1).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^7 \times 3/32$  para las siete variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del cadmio

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Recuperación
1	12	2	0,5	300	190	0,1	4	86,5
2	12	2	0,5	300	90	0,1	2	41,6
3	0	0,5	4	300	190	0,1	4	0
4	0	0,5	0,5	300	190	3	2	0
5	12	0,5	4	300	90	3	2	59,0
6	0	2	4	100	190	0,1	2	0
7	6	1,25	2,25	200	140	1,55	3	70,2
8	12	2	4	100	190	3	2	81,7
9	0	2	4	300	90	3	4	0
10	0	2	0,5	100	90	3	4	0
11	12	0,5	0,5	100	190	3	4	83,3
12	0	0,5	0,5	100	90	0,1	2	0
13	12	0,5	4	100	90	0,1	4	23,1

Tabla XC (2).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^7 \times 3/32$  para las siete variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del cobalto

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Recuperación
1	0	2	4	100	190	0,1	2	0
2	12	2	0,5	300	90	0,1	2	39,2
3	0	0,5	0,5	300	190	3	2	0
4	12	0,5	4	300	90	3	2	40,6
5	12	2	0,5	300	190	0,1	4	75,9
6	12	2	4	100	190	3	2	70,1
7	12	0,5	4	100	90	0,1	4	5,3
8	0	0,5	0,5	100	90	0,1	2	0
9	0	0,5	4	300	190	0,1	4	0
10	12	0,5	0,5	100	190	3	4	75,9
11	0	2	4	300	90	3	4	0
12	0	2	0,5	100	90	3	4	0
13	6	1,25	2,25	200	140	1,55	3	60

Tabla XC (3).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^7 \times 3/32$  para las siete variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del cromo

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Recuperación
1	12	2	0,5	300	90	0,1	2	30,2
2	12	2	4	100	190	3	2	50,1
3	0	2	4	100	190	0,1	2	0
4	0	0,5	0,5	100	90	0,1	2	0
5	12	2	0,5	300	190	0,1	4	50,9
6	12	0,5	4	100	90	0,1	4	5,3
7	12	0,5	0,5	100	190	3	4	55,9
8	0	2	4	300	90	3	4	0
9	0	2	0,5	100	90	3	4	0
10	0	0,5	0,5	300	190	3	2	0
11	12	0,5	4	300	90	3	2	25,6
12	0	0,5	4	300	190	0,1	4	0
13	6	1,25	2,25	200	140	1,55	3	60

Tabla XC (4).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^7 \times 3/32$  para las siete variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del cobre

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Recuperación
1	0	2	4	100	190	0,1	2	0
2	12	2	0,5	300	90	0,1	2	20,3
3	12	2	0,5	300	190	0,1	4	61,4
4	12	0,5	4	100	90	0,1	4	5,9
5	0	0,5	0,5	100	90	0,1	2	0
6	12	2	4	100	190	3	2	56,6
7	6	1,25	2,25	200	140	1,55	3	71,0
8	0	0,5	0,5	300	190	3	2	0
9	0	0,5	4	300	190	0,1	4	0
10	12	0,5	4	300	90	3	2	50,5
11	0	2	4	300	90	3	4	0
12	0	2	0,5	100	90	3	4	0
13	12	0,5	0,5	100	190	3	4	60,5

Tabla XC (5).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^7 \times 3/32$  para las siete variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del hierro

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Recuperación
1	0	0,5	0,5	100	90	0,1	2	0
2	12	2	0,5	300	90	0,1	2	32,7
3	12	0,5	4	300	90	3	2	50,5
4	12	0,5	0,5	100	190	3	4	74,8
5	12	0,5	4	100	90	0,1	4	12,4
6	12	2	4	100	190	3	2	71,5
7	0	2	0,5	100	90	3	4	0
8	0	2	4	300	90	3	4	0
9	6	1,25	2,25	200	140	1,55	3	60,6
10	0	0,5	0,5	300	190	3	2	0
11	12	2	0,5	300	190	0,1	4	76,2
12	0	0,5	4	300	190	0,1	4	0
13	0	2	4	100	190	0,1	2	0

Tabla XC (6).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^7 \times 3/32$  para las siete variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del manganeso

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Recuperación
1	12	0,5	4	100	90	0,1	4	21,3
2	0	2	0,5	100	90	3	4	0
3	12	0,5	4	300	90	3	2	58,6
4	0	2	4	300	90	3	4	0
5	0	0,5	0,5	100	90	0,1	2	0
6	12	2	4	100	190	3	2	78,0
7	6	1,25	2,25	200	140	1,55	3	71,1
8	12	0,5	0,5	100	190	3	4	64,3
9	0	0,5	0,5	300	190	3	2	0
10	0	2	4	100	190	0,1	2	0
11	0	0,5	4	300	190	0,1	4	0
12	12	2	0,5	300	190	0,1	4	82,1
13	12	2	0,5	300	90	0,1	2	35,7

Tabla XC (7).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^7 \times 3/32$  para las siete variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del níquel

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Recuperación
1	0	0,5	0,5	100	90	0,1	2	0
2	0	2	0,5	100	90	3	4	0
3	12	0,5	0,5	100	190	3	4	61,4
4	0	0,5	4	300	190	0,1	4	0
5	0	0,5	0,5	300	190	3	2	0
6	0	2	4	300	90	3	4	0
7	12	2	4	100	190	3	2	65,0
8	6	1,25	2,25	200	140	1,55	3	77,7
9	12	0,5	4	300	90	3	2	40,3
10	12	2	0,5	300	190	0,1	4	70,2
11	0	2	4	100	190	0,1	2	0
12	12	2	0,5	300	90	0,1	2	24,7
13	12	0,5	4	100	90	0,1	4	7,5

Tabla XC (8).- Matriz de diseño de Plackett-Burman  $2^7 \times 3/32$  para las siete variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del plomo

Nº Experimento	A	B	C	D	E	F	G	% Recuperación
1	12	0,5	0,5	100	190	3	4	81,9
2	12	2	4	100	190	3	2	76,1
3	12	0,5	4	300	90	3	2	55,6
4	6	1,25	2,25	200	140	1,55	3	68,3
5	0	0,5	0,5	100	90	0,1	2	0
6	0	2	4	100	190	0,1	2	0
7	12	0,5	4	100	90	0,1	4	18,6
8	12	2	0,5	300	190	0,1	4	80,7
9	0	2	0,5	100	90	3	4	0
10	0	2	4	300	90	3	4	0
11	12	2	0,5	300	90	0,1	2	33,6
12	0	0,5	4	300	190	0,1	4	0
13	0	0,5	0,5	300	190	3	2	0

Para conocer qué variables son significativas, es decir aquellas que van a tener una gran influencia sobre el % Recuperación de los metales, se recurre a la Carta Pareto estandarizada (Figuras 75 (I-VIII)).

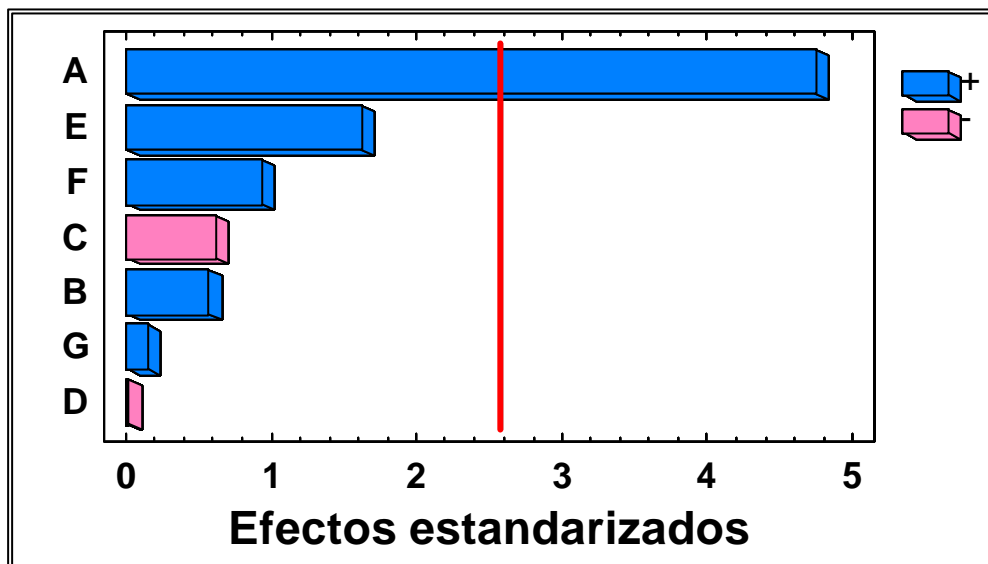


Figura 75(I).- Preconcentración de cadmio. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

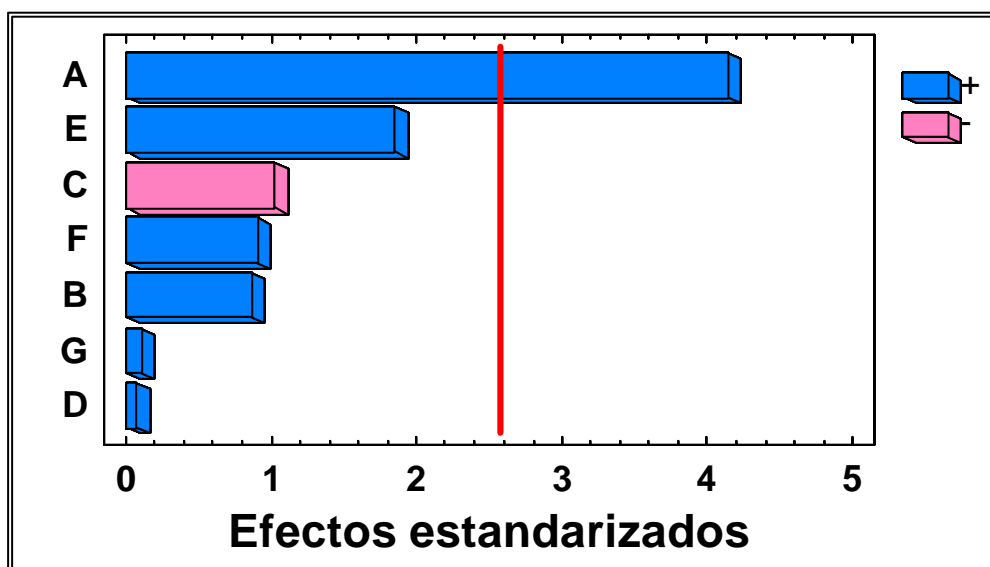


Figura 75 (II).- Preconcentración de cobalto. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

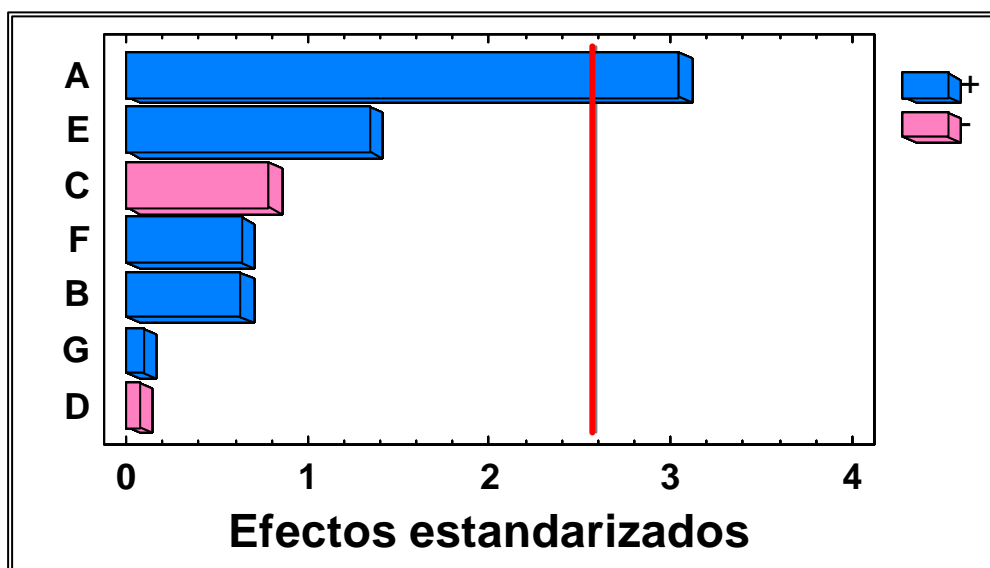


Figura 75(III).- Preconcentración de cromo. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

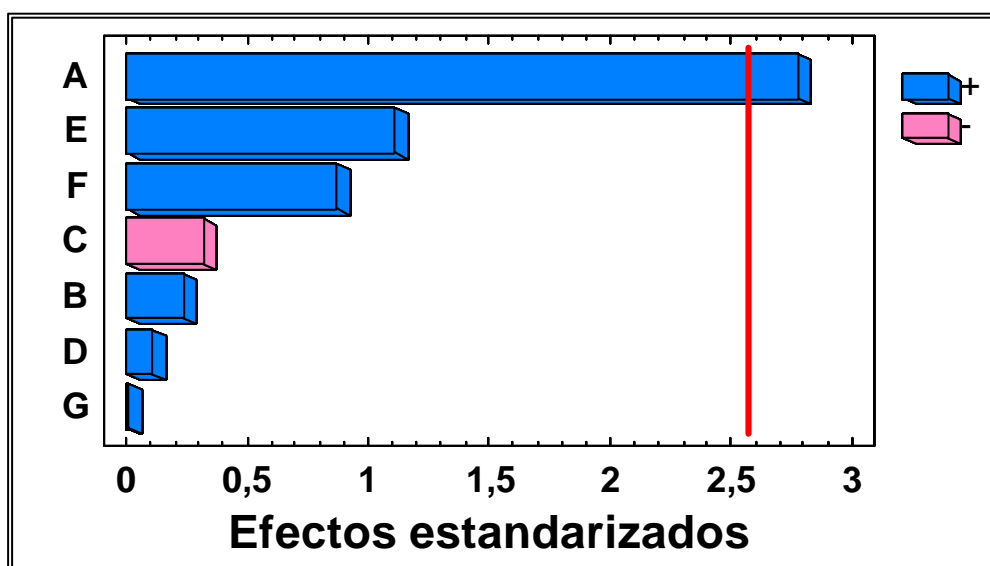


Figura 75(IV).- Preconcentración de cobre. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

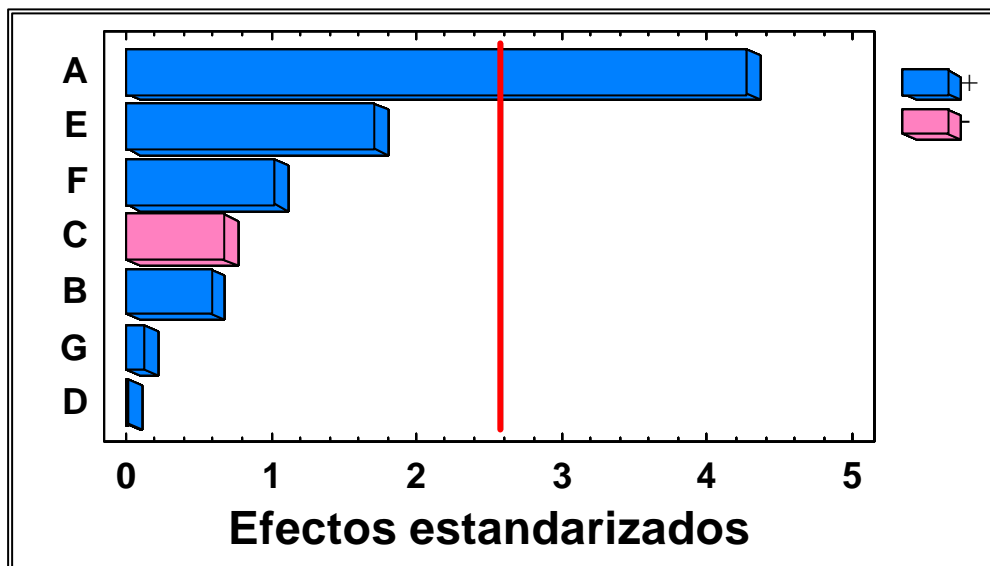


Figura 75(V).- Preconcentración de hierro. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

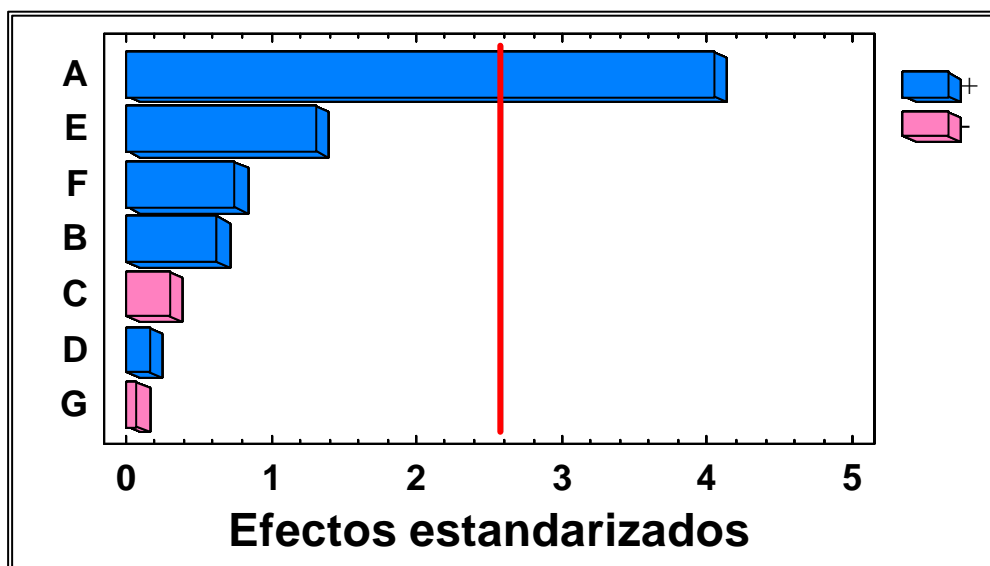


Figura 75(VI).- Preconcentración de manganeso. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

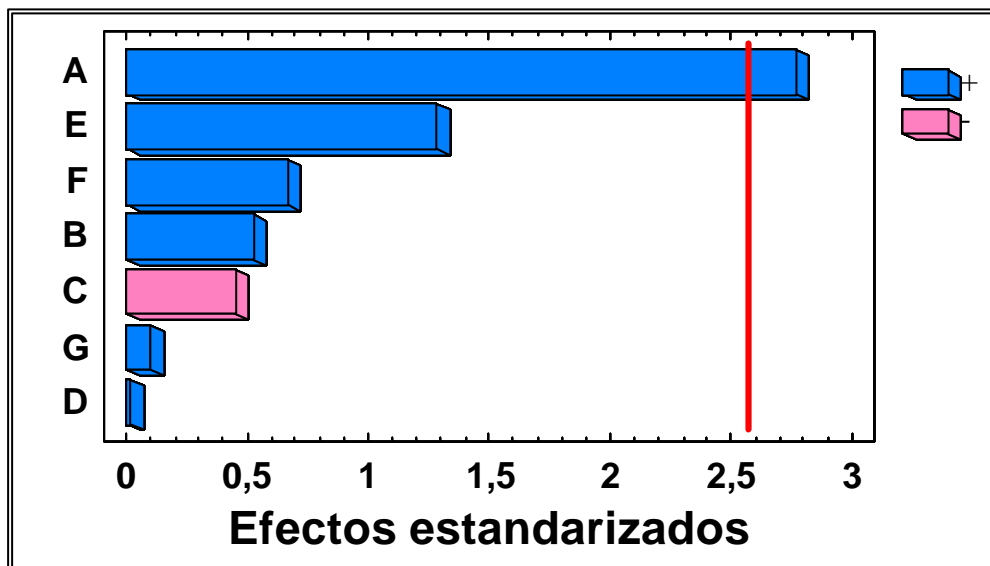


Figura 75(VII).- Preconcentración de níquel. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

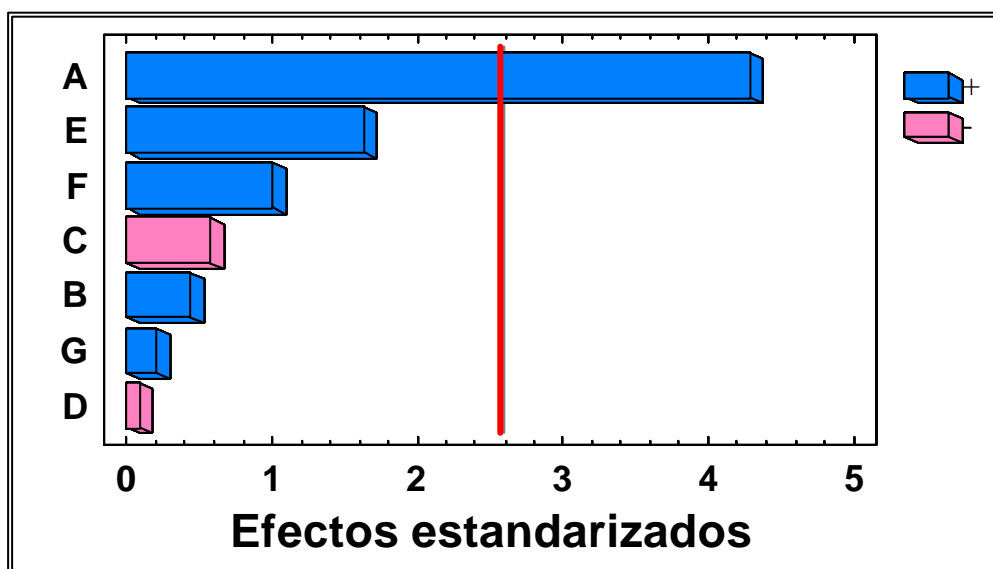


Figura 75(VIII).- Preconcentración de plomo. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución



El valor de los efectos estimados en las Cartas Pareto para cada una de las variables se indican en la Tabla XCI.

Tabla XCI.- Efectos estimados de cada una de las variables estudiadas

VARIABLE	EFECTO ESTIMADO							
	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb
Concentración de AA	62,5	51,2	36,3	42,5	53,0	56,7	44,9	57,8
Caudal de la disolución de AA	7,4	10,6	7,4	3,6	7,1	8,6	8,5	5,7
Caudal de muestreo	-7,9	-12,5	-9,3	-4,9	-8,2	-4,0	-7,3	-7,7
Longitud del reactor de mezcla	-0,2	0,7	-0,8	1,5	0,1	2,1	0,2	-1,1
Volumen de eluyente (HCl)	21,3	22,8	16,0	17,0	21,2	18,1	19,7	21,8
Concentración de eluyente (HCl)	12,1	11,0	9,5	13,3	12,6	10,3	10,7	13,5
Caudal de elución (caudal del agua ultrapura)	1,8	1,2	1,0	0,1	1,5	-0,8	1,5	2,7

En las Figuras 76(I-VIII) se representa mediante líneas la influencia de los efectos principales en la etapa de preconcentración de los metales en la resina Chelite Che utilizando el sistema FIA de la Figura 74.

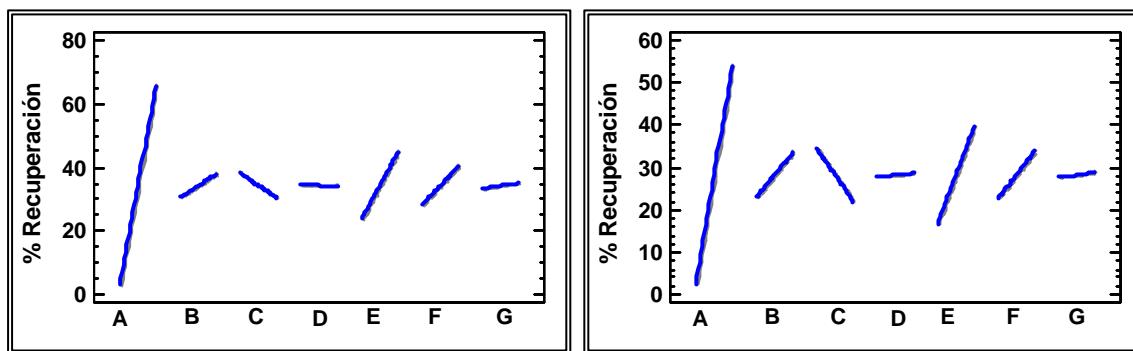


Fig. 76(I).-Preconcentración de Cd Fig.76(II).- Preconcentración de Co  
Representación de los efectos principales de las siete variables que afectan al proceso de preconcentración. A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

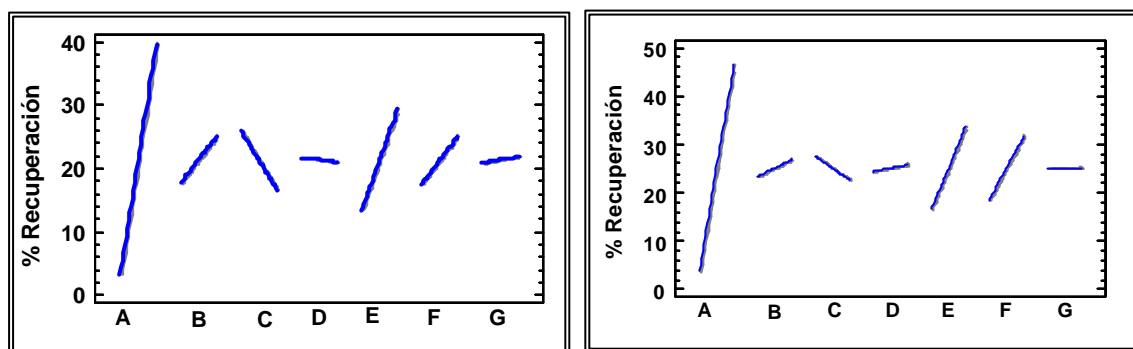


Fig. 76(III).-Preconcentración de Cr Fig.76(IV).- Preconcentración de Cu  
Representación de los efectos principales de las siete variables que afectan al proceso de preconcentración. A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

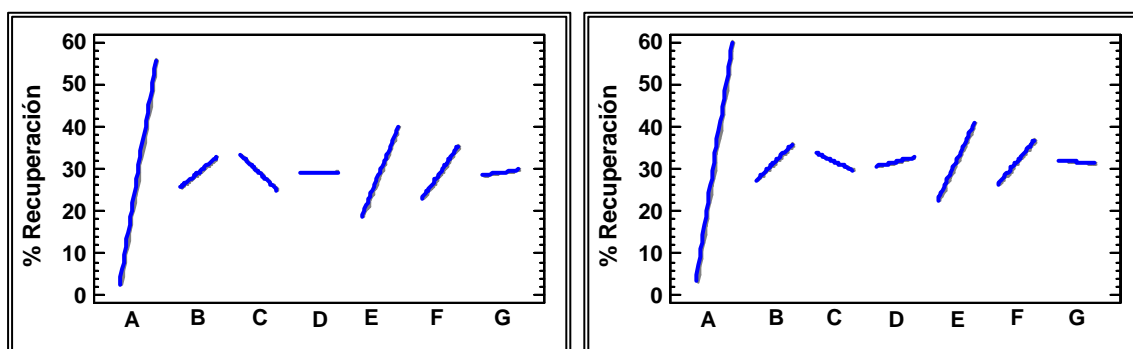


Fig. 76(V).-Preconcentración de Fe Fig.76(VI).- Preconcentración de Mn  
Representación de los efectos principales de las siete variables que afectan al proceso de preconcentración. A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

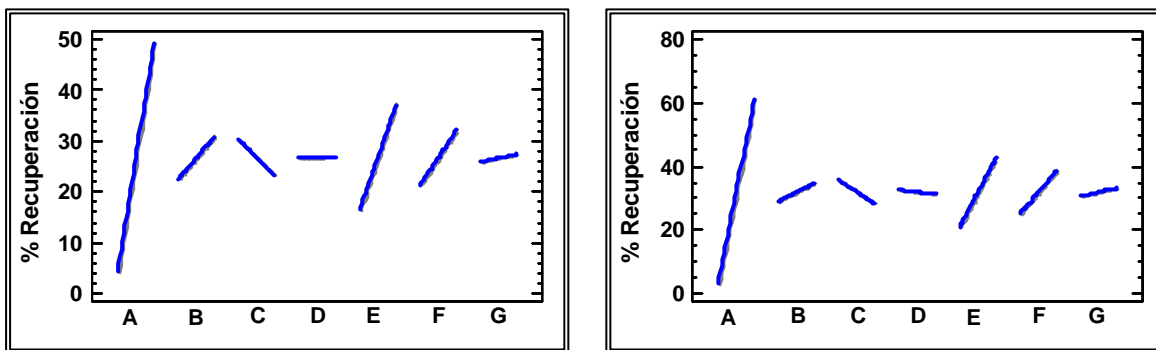


Fig. 76(VII).-Preconcentración de Ni Fig.76(VIII).- Preconcentración de Pb  
Representación de los efectos principales de las siete variables que afectan al proceso de preconcentración. A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

#### 2.1.1. Conclusiones del diseño de screening (Plackett-Burman)

A partir de las cartas Pareto (Figuras 75 (I-VIII)) y de la representación de los efectos principales (Figuras 76 (I-VIII)) se establecen las siguientes conclusiones.

\* Para la preconcentración de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni y Pb en la resina Chelite Che, la concentración de acetato amónico es la única variable estadísticamente significativa, observándose que cuanto mayor es su valor mayor es el % de Recuperación. Las demás variables presentan efectos estimados positivos (caudal de acetato amónico, volumen de eluyente (HCl) y concentración de eluyente (HCl)) y negativos (caudal de muestra). La longitud del reactor de mezcla y el caudal de elución presentan efectos estimados muy pequeños.

En función de cada variable:

\* Concentración de acetato amónico: En todos los casos la concentración de acetato amónico es una variable estadísticamente significativa con efecto estimado positivo. Esto se debe a que proporciona el pH adecuado para que los metales sean retenidos en la resina, ya que previamente se encuentran en un medio muy ácido desfavorable para su retención.

\* Caudal de acetato amónico: En ninguno de los casos es una variable estadísticamente significativa y siempre presenta un efecto estimado positivo, lo que indica que el % de Recuperación es directamente proporcional a dicho factor. Cuanto mayor es el caudal, mayor proporción de acetato amónico se adiciona a la muestra, lo cual ayuda a conseguir el pH óptimo de retención.

\* Caudal de muestra: En ninguno de los casos es una variable estadísticamente significativa y siempre presenta un efecto estimado negativo, lo que indica que el % de Recuperación es inversamente proporcional a dicho factor. Sin embargo, caudales de muestreo pequeños suponen elevados tiempos de análisis, y por lo tanto una reducción de la frecuencia de muestreo.

\* Longitud del reactor de mezcla: En ninguno de los casos es una variable estadísticamente significativa y siempre presenta un efecto estimado muy pequeño.

\* Volumen de eluyente (HCl): En ninguno de los casos es una variable estadísticamente significativa, pero siempre presenta un efecto estimado positivo, lo que indica que el % de Recuperación es directamente proporcional a dicho factor, el decir la elución de los metales se ve favorecida cuanto mayor es el volumen de eluyente utilizado.

\* Concentración de eluyente (HCl): En ninguno de los casos es una variable estadísticamente significativa y siempre presenta un efecto estimado positivo, lo que indica que el % de Recuperación es directamente proporcional a dicho factor.

\* Caudal de elución: : En ninguno de los casos es una variable estadísticamente significativa y siempre presenta un efecto estimado muy pequeño.

Se reevaluó el modelo reducido (se eliminaron del sistema aquellos factores que eran considerados originalmente, pero que no parecían tener influencia sobre el mismo en el intervalo estudiado: longitud del reactor de mezcla y caudal de elución) pudiéndose considerar las interacciones de segundo orden. La Figura 77 (I-VIII) recoge los resultados obtenidos. Como se muestra en esta figura, ninguna interacción de segundo orden es estadísticamente significativa, por lo que se puede variar el valor de una de estas variables sin que se vea afectado el valor de cualquier otra.

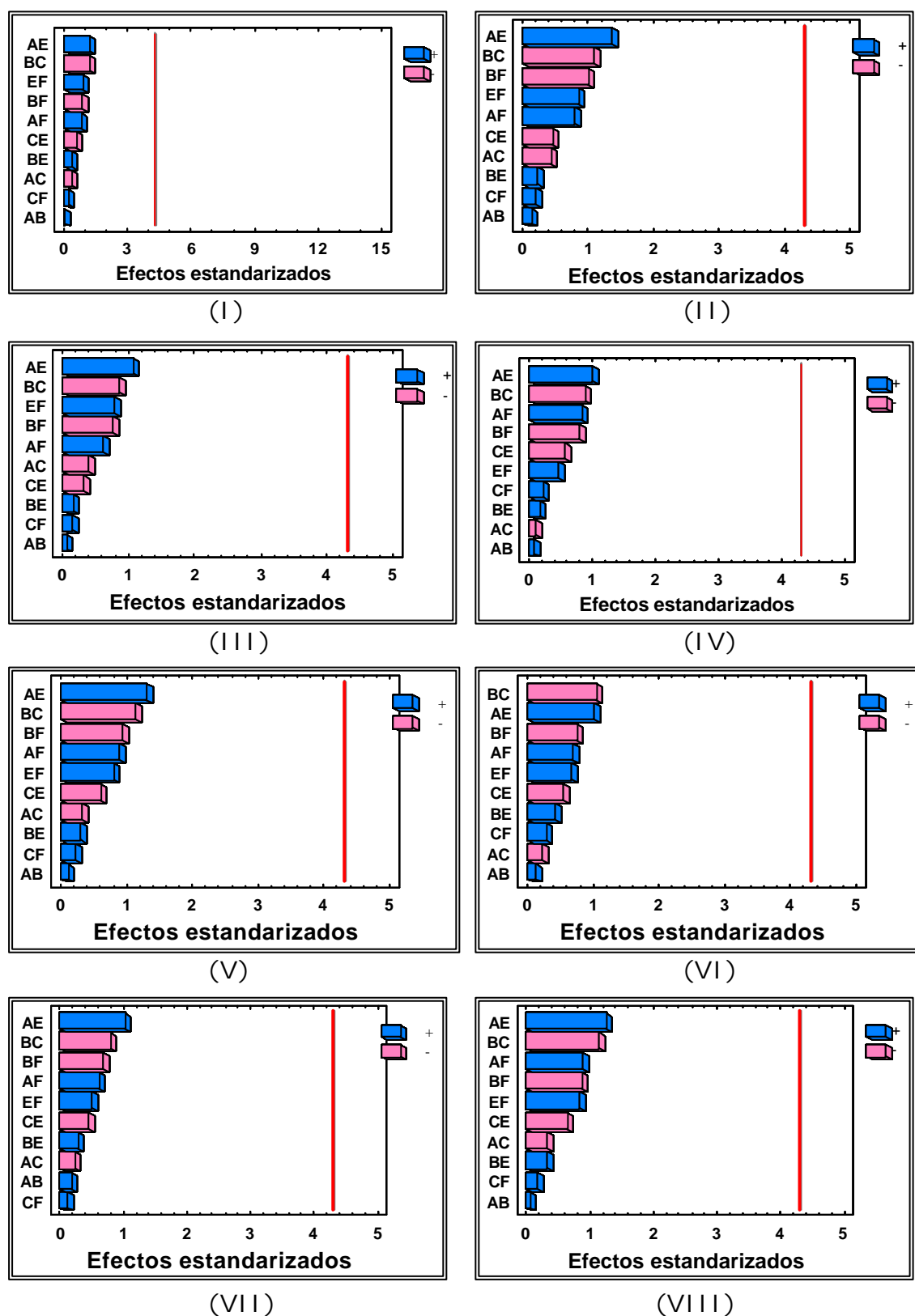


Fig. 77.- Cartas Pareto después de descartar las variables que no parecían tener influencia sobre el proceso de preconcentración en el intervalo estudiado. La línea vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl). (I) Cd; (II) Co; (III) Cr; (IV) Cu; (V) Fe; (VI) Mn; (VII) Ni; (VIII) Pb

Todo lo concluido a partir de la Carta Pareto se corrobora con los gráficos de respuesta para el modelo (en forma de cubo) que proporciona el análisis de Plackett-Burman. En estas gráficas se demuestra que en todos los casos el máximo % Recuperación se obtiene para el valor máximo de concentración de acetato amónico estudiado (12 M) (Figuras 78 (I-VIII)).

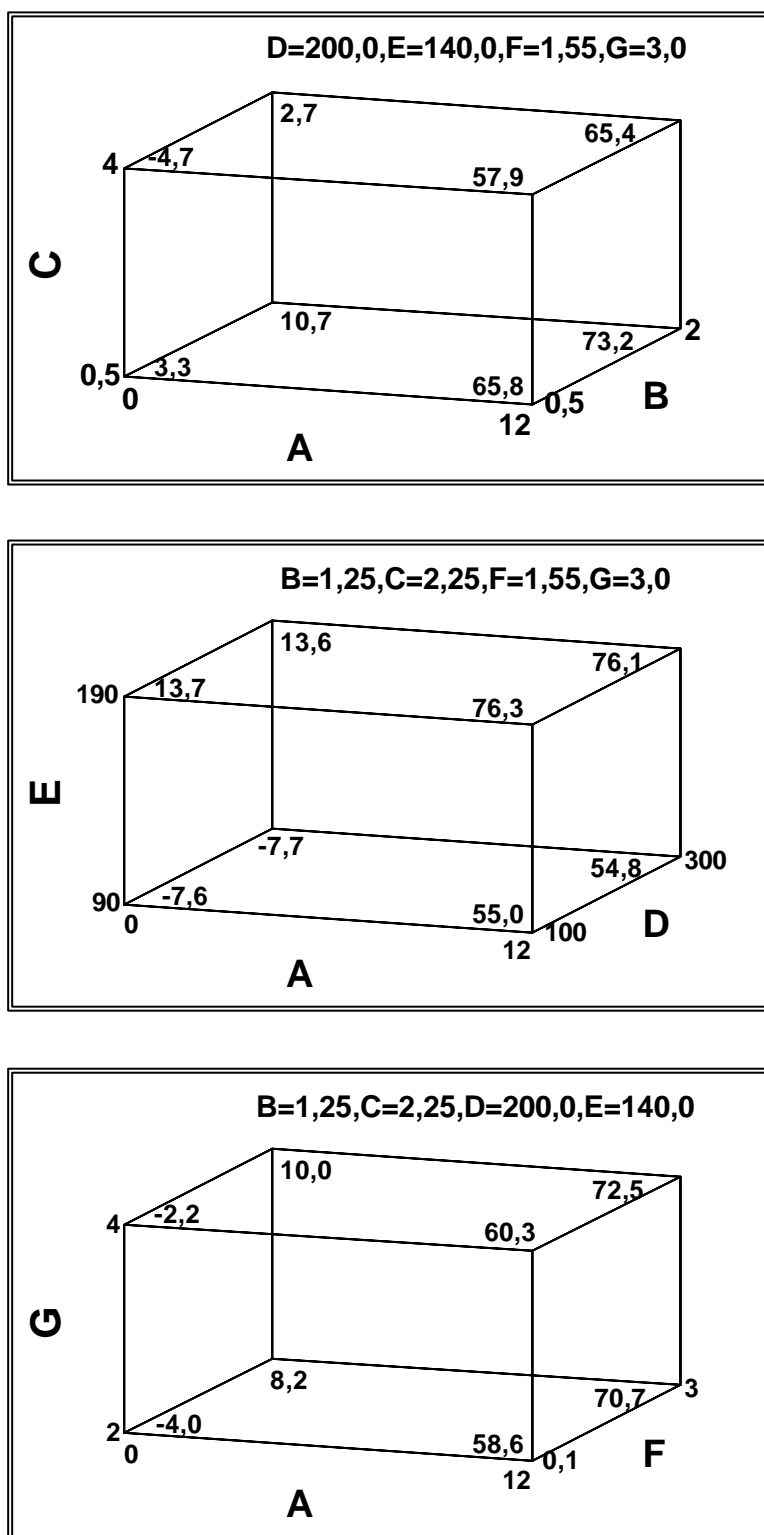


Figura 78 (I).- Gráficos de respuesta para el modelo en forma de cubo proporcionados por el diseño de Plackett-Burman en la preconcentración de cadmio: A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

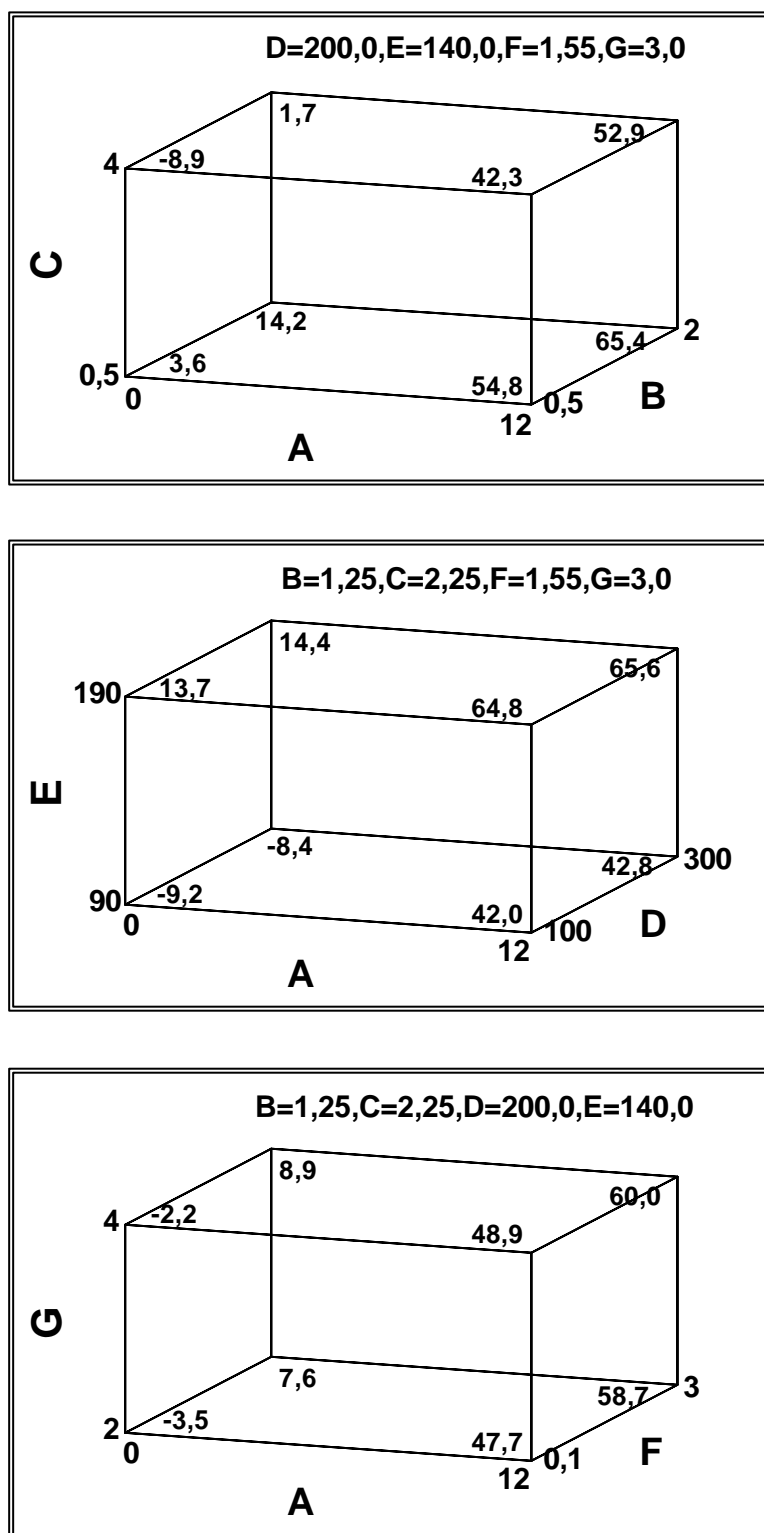


Figura 78 (II).- Gráficos de respuesta para el modelo en forma de cubo proporcionados por el diseño de Plackett-Burman en la preconcentración de cobalto: A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución



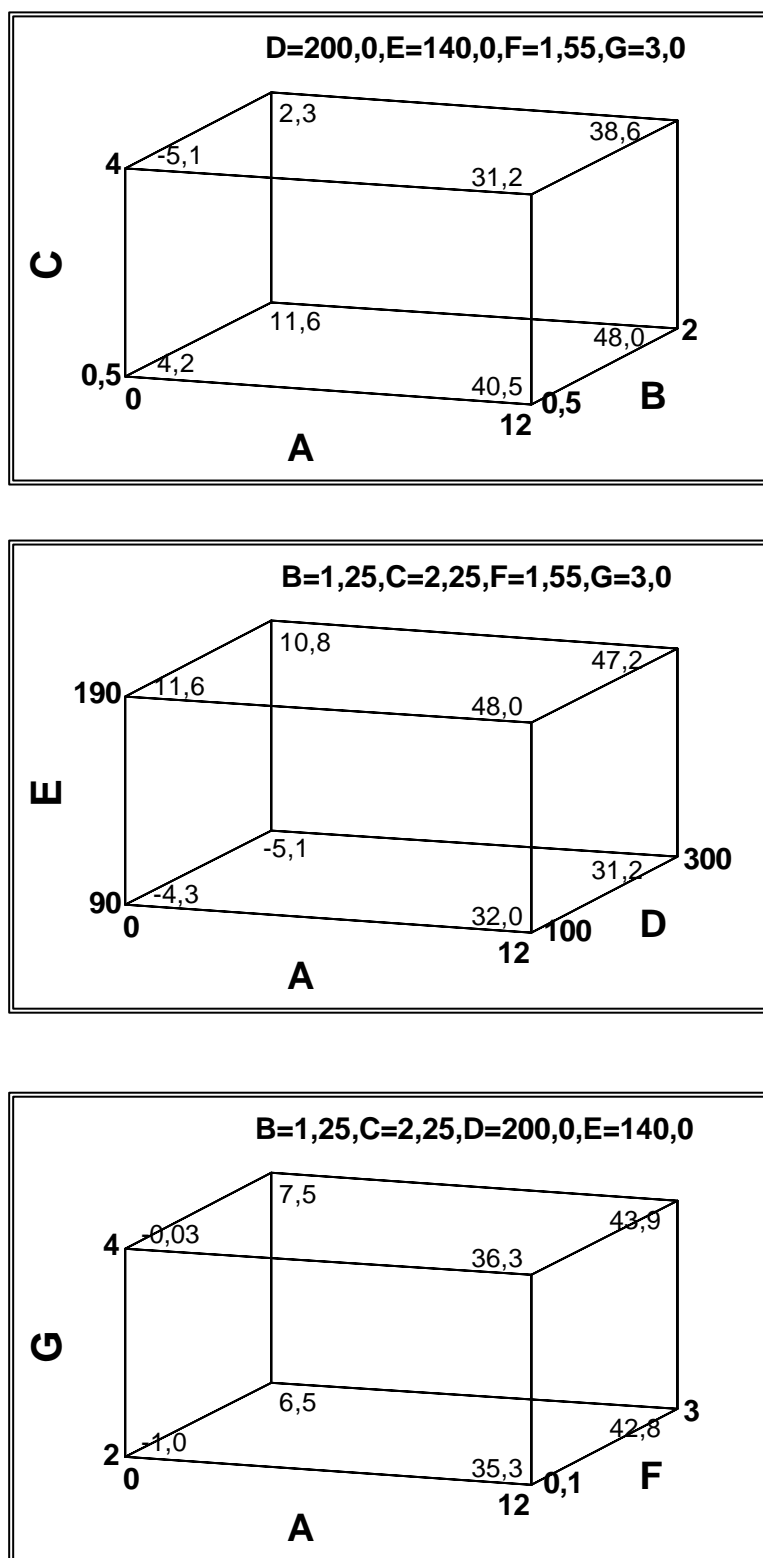


Figura 78 (III).- Gráficos de respuesta para el modelo en forma de cubo proporcionados por el diseño de Plackett-Burman en la preconcentración de cromo: A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

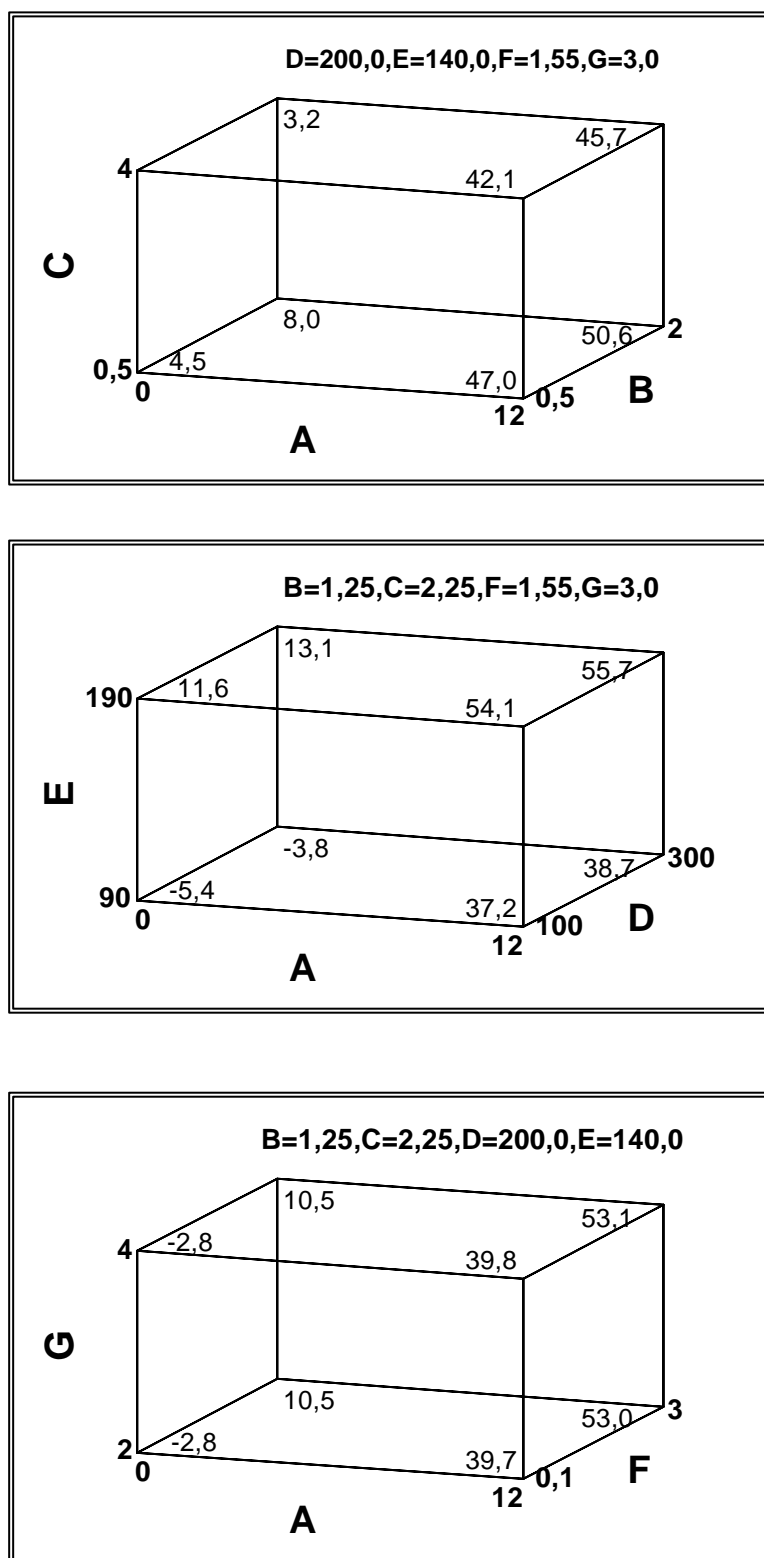


Figura 78 (IV).- Gráficos de respuesta para el modelo en forma de cubo proporcionados por el diseño de Plackett-Burman en la preconcentración de cobre: A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

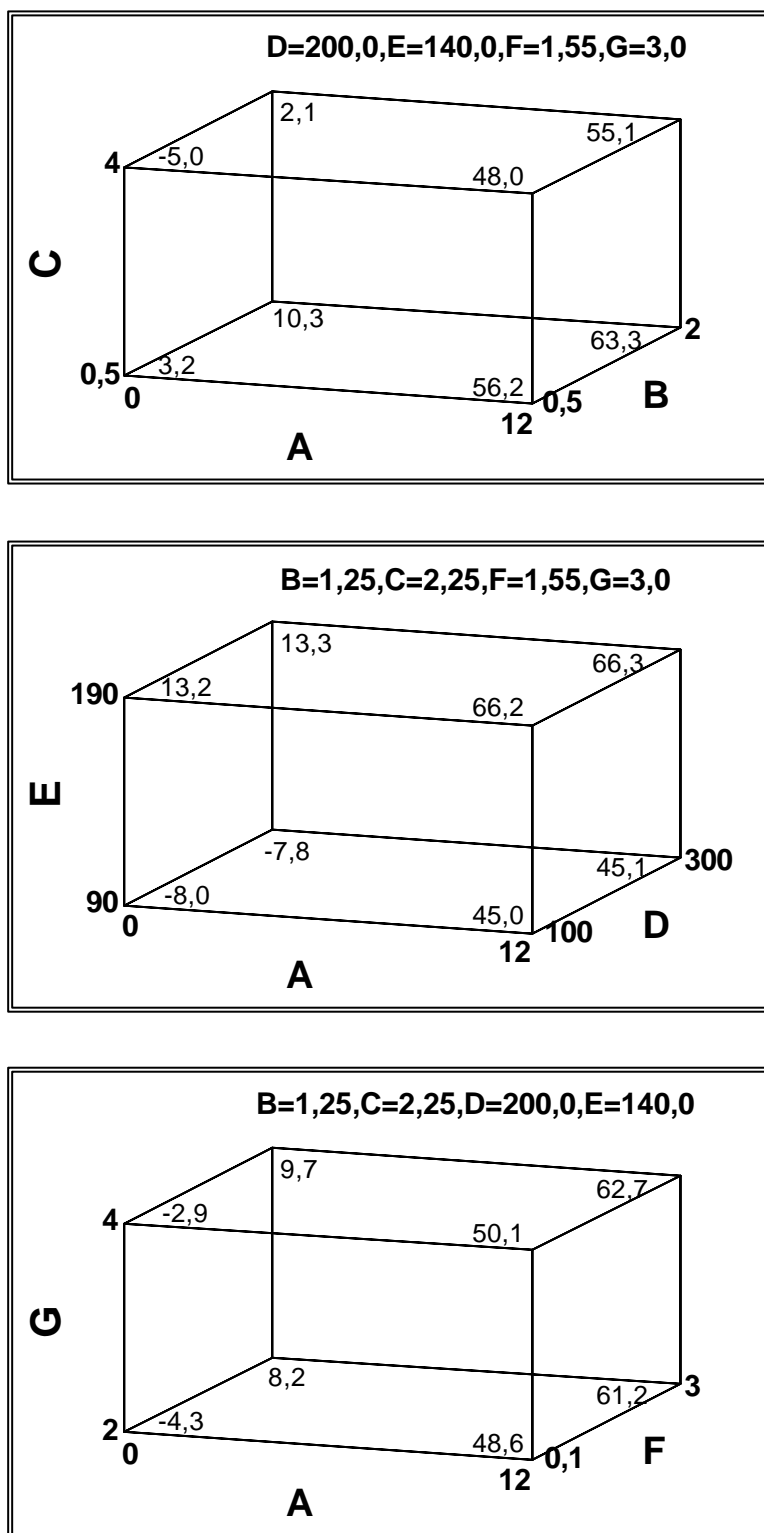


Figura 78 (V).- Gráficos de respuesta para el modelo en forma de cubo proporcionados por el diseño de Plackett-Burman en la preconcentración de hierro: A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

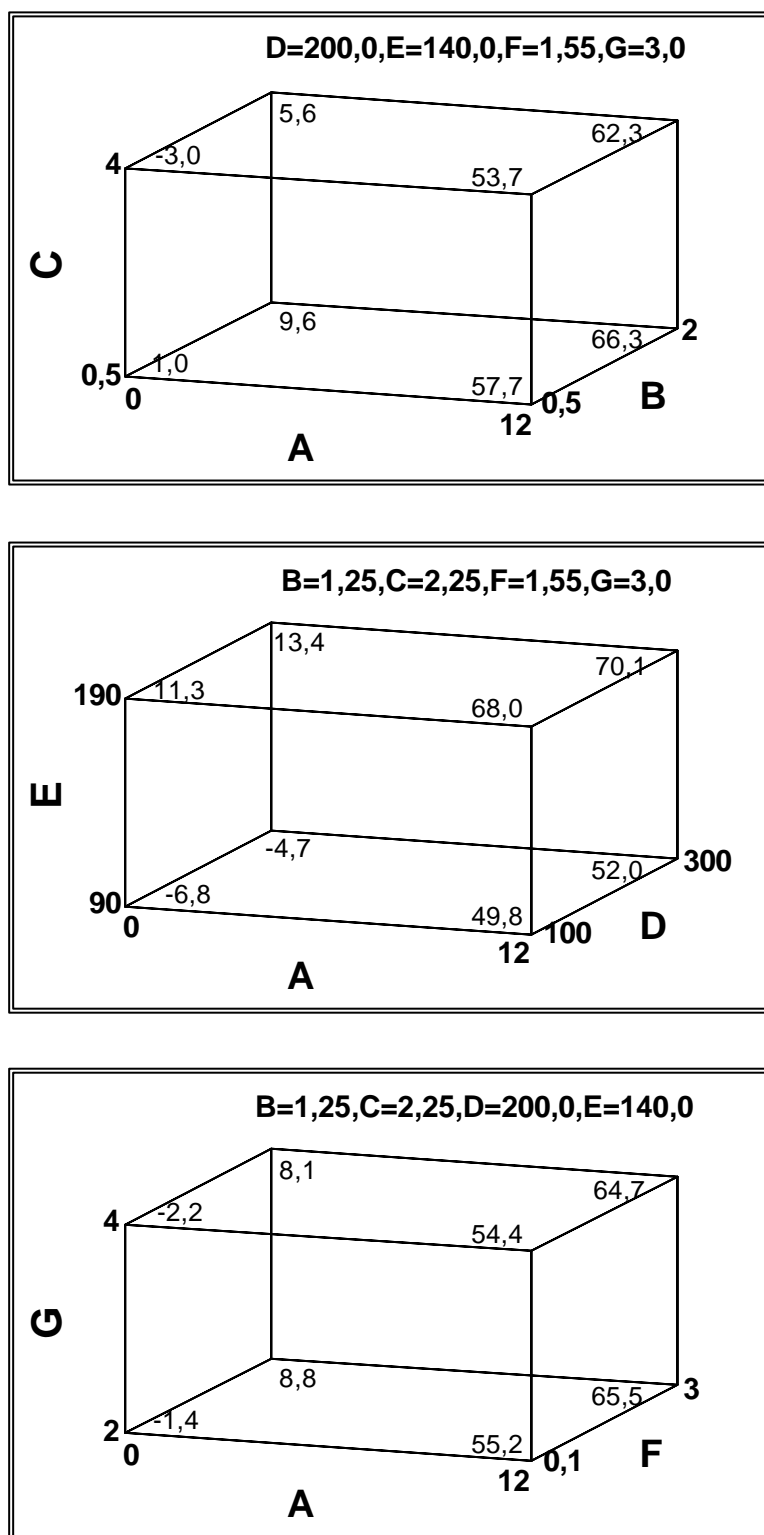


Figura 78 (VI).- Gráficos de respuesta para el modelo en forma de cubo proporcionados por el diseño de Plackett-Burman en la preconcentración de manganeso: A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

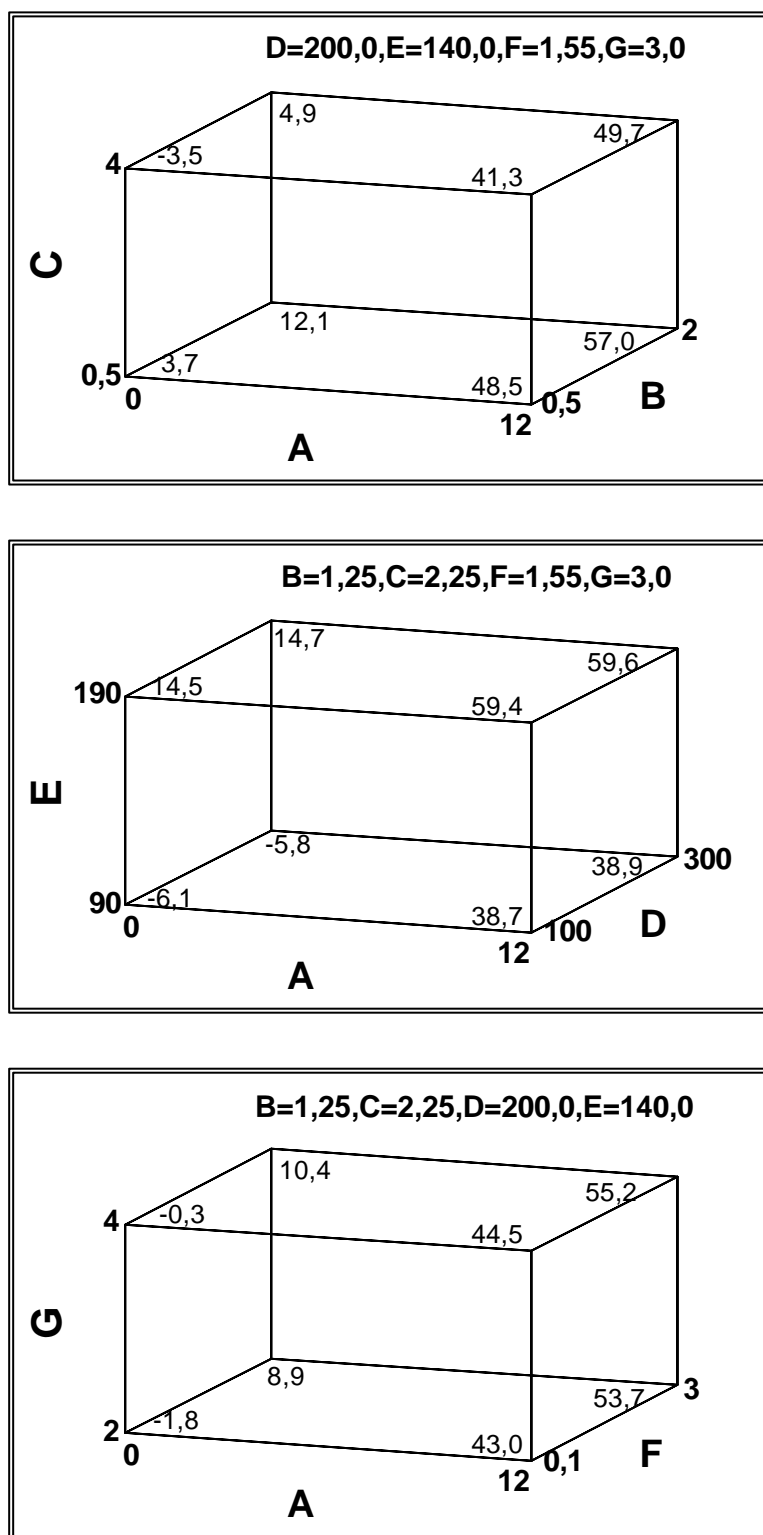


Figura 78 (VII).- Gráficos de respuesta para el modelo en forma de cubo proporcionados por el diseño de Plackett-Burman en la preconcentración de níquel: A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

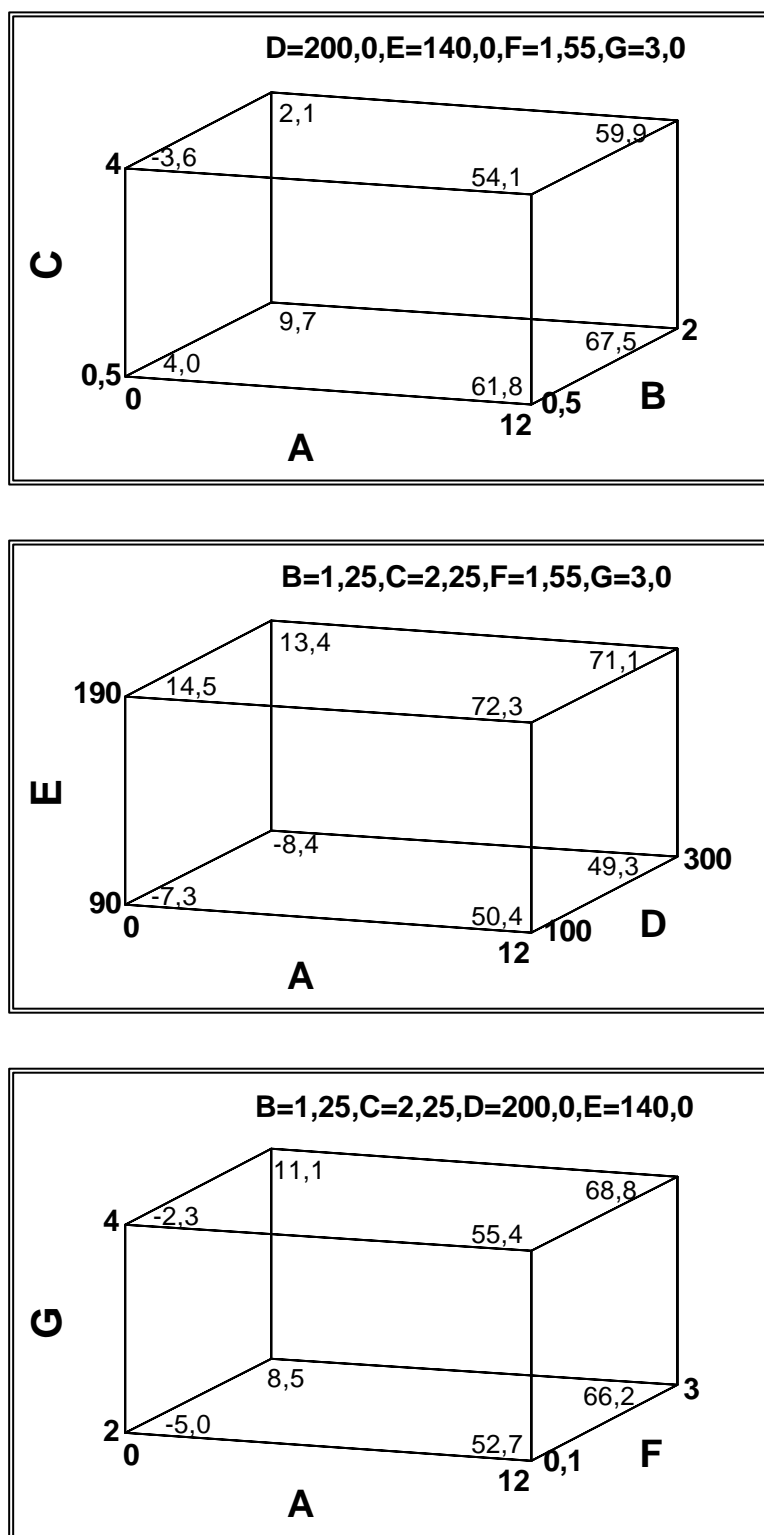


Figura 78 (VIII).- Gráficos de respuesta para el modelo en forma de cubo proporcionados por el diseño de Plackett-Burman en la preconcentración de plomo: A, [acetato amónico]; B, caudal de acetato amónico; C, caudal de muestra; D, longitud del reactor de mezcla; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl); G, caudal de elución

Después de haber realizado el análisis de los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Plackett-Burman, los valores optimizados para cada una de las variables serían los recogidos en la Tabla XCII.

Tabla XCII.- Condiciones establecidas para cada variable según el diseño de Plackett-Burman

VARIABLE	VALORES ESTABLECIDOS POR EL DISEÑO							
	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb
Concentración de acetato amónico (AA) (M)	12	12	12	12	12	12	12	12
Caudal de la disolución de AA (mL/min)	2	2	2	2	2	2	2	2
Caudal de muestreo (mL/min)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Longitud del reactor de mezcla (cm)	100	300	100	300	300	300	300	100
Volumen de eluyente (HCl) (μL)	190	190	190	190	190	190	190	190
Concentración de eluyente (HCl) (M)	3	3	3	3	3	3	3	3
Caudal de elución (caudal del agua ultrapura) (mL/min)	4	4	4	4	4	2	4	4

## 2.2. Diseños de Superficie de Respuesta

Una vez realizado el estudio de screening, se aplicó un diseño de superficie de respuesta para obtener los valores óptimos de las variables.

Antes de realizar el diseño factorial de superficie de respuesta, se tuvo en cuenta lo siguiente para cada variable estadísticamente no significativa:

- *Caudal de la disolución de AA*: En todos los casos el diseño de screening establece como óptimo 2 mL/min. Esto quiere decir que se necesita el mayor volumen de AA para obtener el pH óptimo de retención de los metales en la resina.
- *Caudal de muestreo*: El diseño de screening establece en todos los casos como óptimo un caudal de 0,5 mL/min. La utilización de un caudal mayor implicaría más ventajas en cuanto a características analíticas de los métodos desarrollados porque permitiría alcanzar mayor frecuencia de muestreo.
- *Longitud del reactor de mezcla*: Para todos los metales se obtiene un efecto estimado muy pequeño. Por lo que esta variable prácticamente no afecta al proceso de preconcentración. De esta manera, se selecciona una longitud de 100 cm para hacer más corto el circuito de preconcentración y así minimizar la frecuencia de muestreo.
- *Volumen de eluyente (HCl)*: En todos los casos el diseño de screening establecería como óptimo el valor más alto probado para la variable (190  $\mu$ L). Sin embargo, sería interesante estudiar la posibilidad de poder reducirlo para incrementar el factor de preconcentración, y en consecuencia la sensibilidad de la metodología analítica.
- *Concentración de eluyente (HCl)*: El diseño de screening propone como óptimo el valor más alto estudiado para esta variable (3M). Valores más altos para esta variable no se estudian porque podrían causar daños importantes en el nebulizador del espectrofotómetro de absorción atómica con llama. No obstante, se estudiará la posibilidad de reducir la concentración de eluyente.
- *Caudal de elución (caudal del agua ultrapura)*: Para todos los metales se obtiene un efecto estimado muy pequeño. Por lo que esta variable prácticamente no afecta al proceso de elución de los metales de la resina. Como cuanto mayor es el caudal de elución, mayor es el caudal de aspiración del nebulizador del espectrofotómetro de absorción atómica con llama (se utiliza siempre el mismo valor para ambos caudales), se incrementa la sensibilidad de la metodología analítica al utilizar el valor más alto de esta variable (4 mL/min). Por tanto, éste fue el valor elegido para esta variable.



Así, con el objetivo de afinar el valor óptimo de la concentración de la disolución de acetato amónico, del caudal de muestreo, y del volumen y concentración de eluyente (HCl), se procedió a realizar un diseño factorial de superficie de respuesta. En la Tabla XCIII se muestra el valor considerado como óptimo para las demás variables.

Tabla XCIII.- Valores óptimos tomados para las variables no consideradas en el diseño factorial de superficie de respuesta para la preconcentración de los metales en la resina

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS							
	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb
Caudal de la disolución de AA (mL/min)	2	2	2	2	2	2	2	2
Longitud del reactor de mezcla (cm)	100	100	100	100	100	100	100	100
Caudal de elución (caudal del agua ultrapura) (mL/min)	4	4	4	4	4	4	4	4

Para poder realizar un diseño de experimentos es necesario fijar un valor máximo y un valor mínimo para cada variable. La Tabla XCIV expone los valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta para la preconcentración de los metales en la resina.

Tabla XCIV.- Valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta para la preconcentración de los metales en la resina

VARIABLE	CLAVE	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
Concentración de acetato amónico (AA) (M)	A	10	12
Caudal de muestreo (mL/min)	C	2	3
Volumen de eluyente (HCl) (μL)	E	110	190
Concentración de eluyente (HCl) (M)	F	1	3

Los valores máximo y mínimo establecidos para cada variable se han elegido en función de estudios previos y de los resultados obtenidos anteriormente en el diseño de screening.

La variable respuesta (%Recuperación) se calculó como se indicó previamente en la página 312.

El diseño factorial aplicado de superficie de respuesta es un diseño central composicional  $2^4 +$  estrella que implica realizar 26 experimentos (Statgraphics Plus 5.1). Las características del diseño son las siguientes:

- Tipo de Diseño: Superficie de respuesta
- Nombre del Diseño: Central Composicional  $2^4 +$  estrella
- Características del diseño: ortogonal
- Número de factores experimentales: 4
- Puntos centrales: 2
- Número de experimentos: 26
- Error grados de libertad: 11
- Aleatorio: Si
- Distancia axial,  $\alpha = 1,48258$

Las Tablas XCV (1-8) muestran las matrices experimentales del diseño incluyendo la variable respuesta, % Recuperación (media obtenida al realizar cada experimento por triplicado).

Una vez obtenidos los resultados experimentales se introducen en cada diseño central composicional para obtener la información necesaria para obtener los valores óptimos de cada variable. Esta búsqueda se llevará acabo con ayuda de los gráficos de respuesta para el modelo que se pueden ver en la Figura 80.

Tabla XCV (1).- Matriz del diseño central composicional  $2^4$  + estrella con sus correspondientes valores del % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del cadmio. A, [acetato amónico]; C, caudal de muestra; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl)

Experimento	A	C	E	F	% Recuperación
1	12	3	190	3	82,6
2	11	2,5	90,6969	2	64,9
3	9,51742	2,5	150	2	70,7
4	10	2	190	1	57,8
5	12	2	190	1	82,6
6	12	3	110	1	61,4
7	12	3	110	3	86,4
8	12	2	190	3	98,5
9	12	3	190	1	70,7
10	10	2	110	3	84,9
11	12	2	110	3	100,5
12	10	3	110	3	75,3
13	10	3	190	1	55,6
14	10	2	190	3	82,6
15	11	2,5	150	2	75,3
16	10	3	110	1	55,6
17	11	3,24129	150	2	61,4
18	11	2,5	150	3,48258	87,7
19	12,4826	2,5	150	2	87,7
20	11	2,5	209,303	2	75,3
21	11	1,75871	150	2	82,6
22	12	2	110	1	82,6
23	11	2,5	150	2	69,2
24	11	2,5	150	0,517421	35,8
25	10	2	110	1	64,9
26	10	3	190	3	69,2

Tabla XCV (2).- Matriz del diseño central composicional  $2^4$  + estrella con sus correspondientes valores del % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del cobalto. A, [acetato amónico]; C, caudal de muestra; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl)

Experimento	A	C	E	F	% Recuperación
1	10	2	110	3	80,0
2	10	2	110	1	60,0
3	12	2	110	1	77,7
4	10	2	190	1	52,9
5	12	3	190	3	77,7
6	12	3	190	1	65,8
7	12	2	110	3	98,6
8	10	3	190	1	50,7
9	10	3	190	3	64,3
10	10	3	110	1	50,7
11	12	2	190	1	77,7
12	10	3	110	3	70,4
13	12	3	110	3	81,5
14	11	2,5	90,6969	2	60,0
15	12	2	190	3	100,0
16	11	3,24129	150	2	56,5
17	11	2,5	150	2	64,3
18	11	2,5	150	2	70,4
19	12	3	110	1	56,5
20	11	1,75871	150	2	77,7
21	11	2,5	150	0,517421	30,9
22	9,51742	2,5	150	2	65,8
23	11	2,5	209,303	2	70,4
24	10	2	190	3	77,7
25	11	2,5	150	3,48258	82,8
26	12,4826	2,5	150	2	82,8

Tabla XCV (3).- Matriz del diseño central composicional  $2^4$  + estrella con sus correspondientes valores del % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del cromo. A, [acetato amónico]; C, caudal de muestra; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl)

Experimento	A	C	E	F	% Recuperación
1	10	3	190	3	64,0
2	10	2	110	1	64,0
3	11	1,75871	150	2	70,4
4	10	3	110	1	55,8
5	11	2,5	150	3,48258	88,7
6	10	2	190	1	58,9
7	11	2,5	90,6969	2	56,7
8	10	3	190	1	55,8
9	12	3	190	1	66,1
10	10	2	110	3	81,0
11	12	2	190	1	83,0
12	10	3	110	3	75,5
13	9,51742	2,5	150	2	65,8
14	12	2	110	3	101,3
15	12	2	190	3	101,3
16	12	3	110	3	86,6
17	12	3	190	3	77,4
18	11	2,5	150	2	71,9
19	12,4826	2,5	150	2	83,0
20	12	3	110	1	61,6
21	11	3,24129	150	2	52,5
22	11	2,5	150	0,517421	28,7
23	11	2,5	209,303	2	75,5
24	10	2	190	3	77,4
25	11	2,5	150	2	75,5
26	12	2	110	1	82,8

Tabla XCV (4).- Matriz del diseño central composicional  $2^4$  + estrella con sus correspondientes valores del % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del cobre. A, [acetato amónico]; C, caudal de muestra; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl)

Experimento	A	C	E	F	% Recuperación
1	12	2	110	3	101,0
2	10	2	110	1	64,1
3	12	2	110	1	82,5
4	10	3	110	1	55,3
5	12	3	110	1	61,9
6	10	2	190	1	58,9
7	12,4826	2,5	150	2	83,6
8	10	3	190	1	58,9
9	12	3	190	1	66,1
10	10	2	110	3	85,1
11	12	2	190	3	99,7
12	11	2,5	150	0,517421	28,8
13	12	3	110	3	86,9
14	10	2	190	3	77,1
15	11	2,5	150	2	75,5
16	10	3	190	3	64,4
17	12	3	190	3	77,1
18	11	2,5	150	2	71,9
19	9,51742	2,5	150	2	68,8
20	11	1,75871	150	2	70,0
21	11	3,24129	150	2	52,5
22	11	2,5	90,6969	2	56,7
23	11	2,5	209,303	2	75,5
24	12	2	190	1	83,6
25	11	2,5	150	3,48258	86,9
26	10	3	110	3	75,7

Tabla XCV (5).- Matriz del diseño central composicional  $2^4$  + estrella con sus correspondientes valores del % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del hierro. A, [acetato amónico]; C, caudal de muestra; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl)

Experimento	A	C	E	F	% Recuperación
1	10	3	190	3	69,5
2	10	2	110	1	64,2
3	11	3,24129	150	2	60,7
4	12	2	110	3	99,8
5	12	3	110	1	60,7
6	10	2	190	1	57,1
7	12	2	190	1	81,9
8	11	2,5	150	2	68,5
9	12	3	190	1	70,0
10	11	2,5	150	0,517421	35,1
11	10	3	190	1	54,9
12	10	3	110	3	74,6
13	12	3	110	3	85,7
14	10	2	190	3	81,9
15	12	2	190	3	101,2
16	9,51742	2,5	150	2	70,0
17	12	3	190	3	81,9
18	11	2,5	90,6969	2	64,0
19	12,4826	2,5	150	2	87,0
20	11	1,75871	150	2	81,9
21	12	2	110	1	81,9
22	11	2,5	150	3,48258	87,0
23	11	2,5	209,303	2	74,6
24	10	2	110	3	84,2
25	10	3	110	1	54,9
26	11	2,5	150	2	74,6

Tabla XCV (6).- Matriz del diseño central composicional  $2^4$  + estrella con sus correspondientes valores del % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del manganeso. A, [acetato amónico]; C, caudal de muestra; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl)

Experimento	A	C	E	F	% Recuperación
1	11	2,5	150	2	54,7
2	10	2	110	1	60,1
3	12	2	110	1	77,7
4	9,51742	2,5	150	2	60,1
5	11	1,75871	150	2	81,4
6	10	2	190	1	52,9
7	12	2	190	1	77,7
8	11	2,5	150	0,517421	25,7
9	12	3	190	1	55,9
10	10	2	110	3	81,4
11	11	2,5	150	3,48258	77,7
12	10	3	110	3	60,1
13	11	2,5	209,303	2	65,3
14	10	2	190	3	77,7
15	12	2	190	3	100,3
16	12,4826	2,5	150	2	77,7
17	12	3	190	3	67,7
18	12	3	110	1	46,5
19	10	3	110	1	40,7
20	10	3	190	1	40,7
21	11	3,24129	150	2	50,5
22	11	2,5	90,6969	2	60,1
23	11	2,5	150	2	65,3
24	12	3	110	3	71,5
25	12	2	110	3	98,6
26	10	3	190	3	58,3



Tabla XCV (7).- Matriz del diseño central composicional  $2^4$  + estrella con sus correspondientes valores del % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del níquel. A, [acetato amónico]; C, caudal de muestra; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl)

Experimento	A	C	E	F	% Recuperación
1	11	2,5	150	3,48258	82,8
2	11	2,5	150	0,517421	30,3
3	12	2	110	1	82,8
4	10	3	110	1	43,0
5	11	3,24129	150	2	55,6
6	10	2	190	1	58,0
7	12	2	190	1	84,8
8	9,51742	2,5	150	2	65,2
9	12	3	190	1	61,0
10	10	2	110	3	80,5
11	12	3	190	3	76,6
12	10	3	110	3	65,2
13	11	1,75871	150	2	86,5
14	10	2	190	3	82,8
15	12	2	190	3	100,1
16	10	3	190	3	63,4
17	12	2	110	3	101,5
18	12	3	110	3	76,6
19	12,4826	2,5	150	2	82,8
20	10	3	190	1	45,8
21	11	2,5	150	2	72,8
22	11	2,5	90,6969	2	55,6
23	11	2,5	209,303	2	72,8
24	12	3	110	1	51,6
25	10	2	110	1	65,2
26	11	2,5	150	2	70,4

Tabla XCV (8).- Matriz del diseño central composicional  $2^4$  + estrella con sus correspondientes valores del % Recuperación de cada experimento para la preconcentración del plomo. A, [acetato amónico]; C, caudal de muestra; E, volumen de eluyente (HCl); F, concentración de eluyente (HCl)

Experimento	A	C	E	F	% Recuperación
1	11	2,5	150	2	60,9
2	9,51742	2,5	150	2	62,9
3	12	2	110	1	83,6
4	10	3	110	1	47,3
5	12,4826	2,5	150	2	81,8
6	10	2	190	1	58,2
7	12	2	190	1	84,7
8	11	2,5	150	3,48258	88,8
9	12	3	190	1	65,8
10	10	2	110	3	80,0
11	12	3	190	3	77,7
12	10	3	110	3	60,9
13	12	3	110	3	71,5
14	11	1,75871	150	2	77,7
15	12	2	190	3	100,0
16	10	3	190	3	64,3
17	11	2,5	209,303	2	71,5
18	12	3	110	1	52,8
19	10	3	190	1	52,8
20	11	3,24129	150	2	56,5
21	12	2	110	3	98,7
22	11	2,5	150	2	77,7
23	11	2,5	150	0,517421	30,9
24	10	2	110	1	66,6
25	10	2	190	3	77,7
26	11	2,5	90,6969	2	66,6

### 2.2.1. Conclusiones del diseño de superficie de respuesta

El análisis de los resultados de la Tablas XCV (1-8) da lugar a las Cartas Pareto que se muestran en las Figura 79 (I-VIII). Como se puede observar, para todos los metales estudiados la concentración de AA (A), la concentración de eluyente (F) y el caudal de muestreo (C) son variables estadísticamente significativas. Las dos primeras (A y F) presentan un signo positivo, mientras que la tercera (C) presenta un signo negativo. Por último, el volumen de eluyente (E) es una variable que no es estadísticamente significativa. Esta variable presenta un signo positivo, pero tiene poca influencia en la preconcentración de todos los metales en la resina (su efecto estimado es muy pequeño).

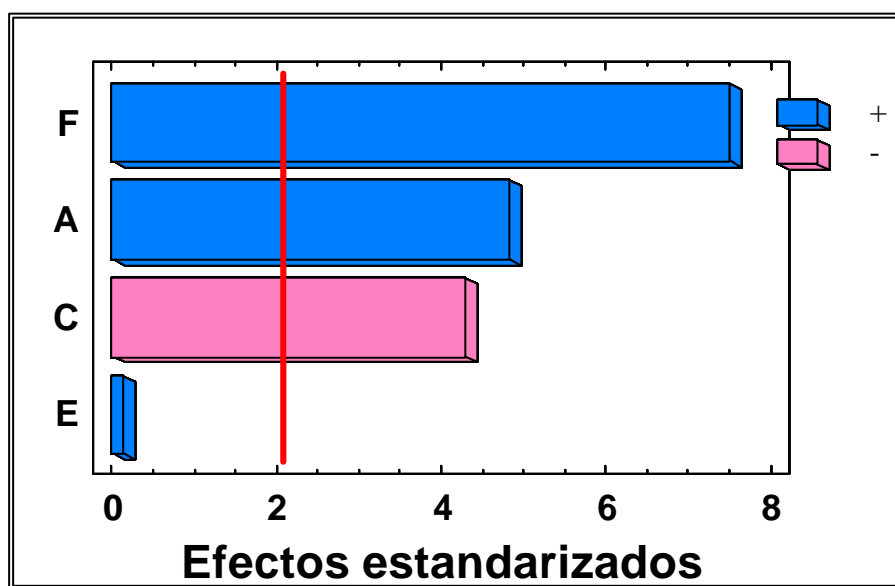


Figura 79 (I).- Preconcentración de cadmio. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente

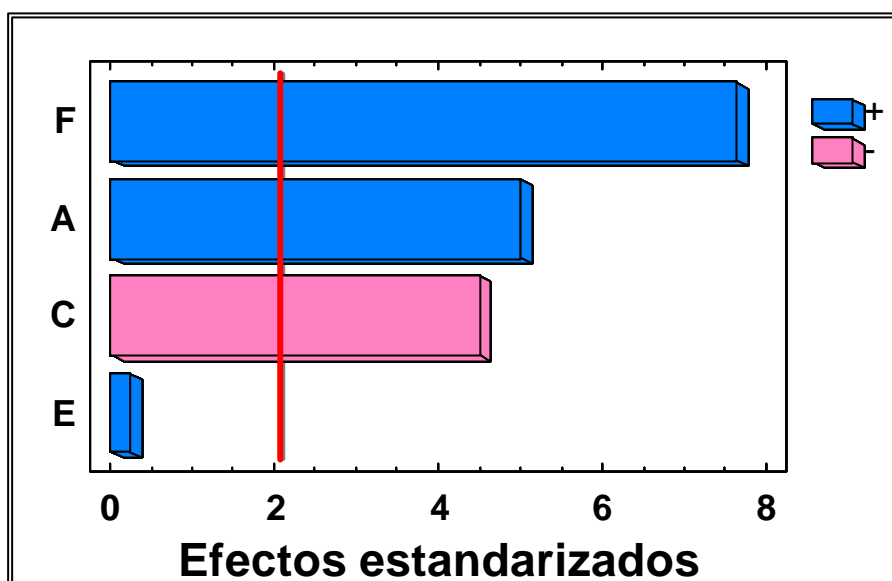


Figura 79 (II).- Preconcentración de cobalto. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente

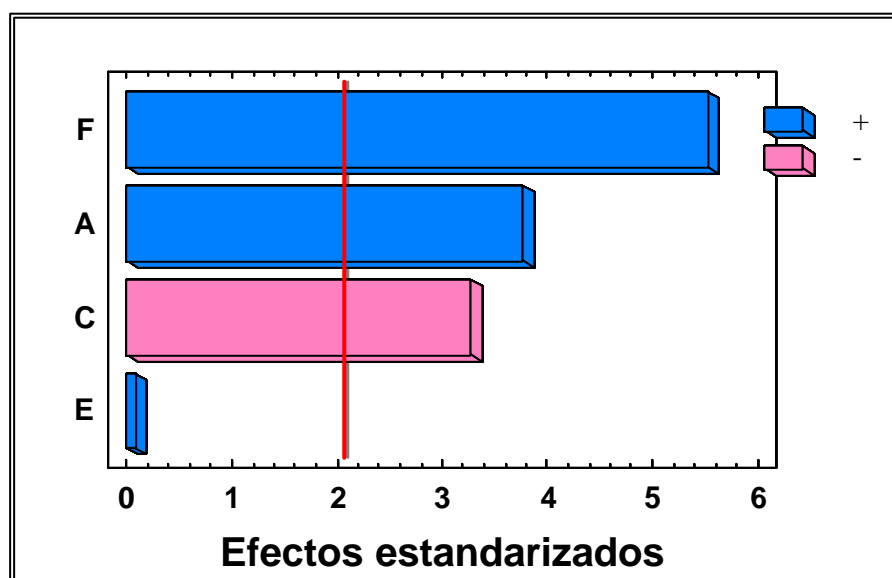


Figura 79 (III).- Preconcentración de cromo. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente

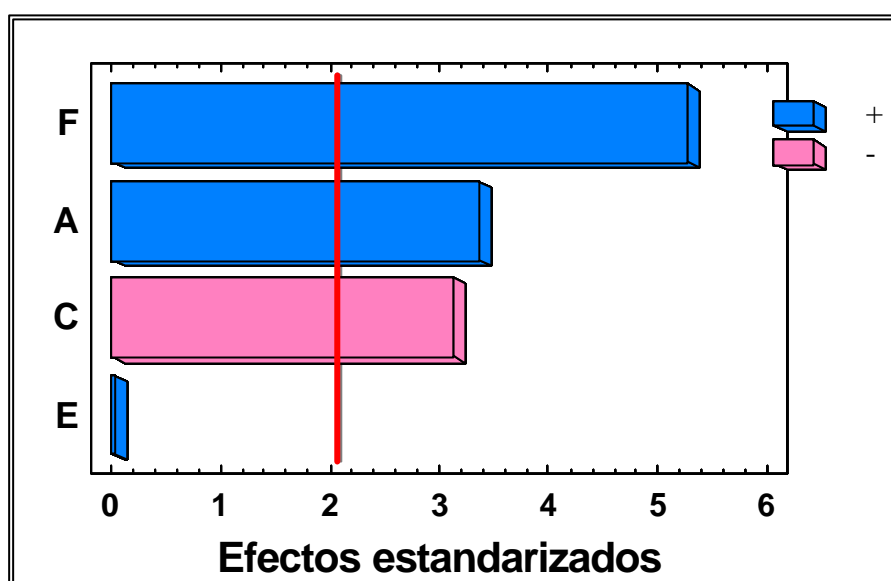


Figura 79 (IV).- Preconcentración de cobre. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente

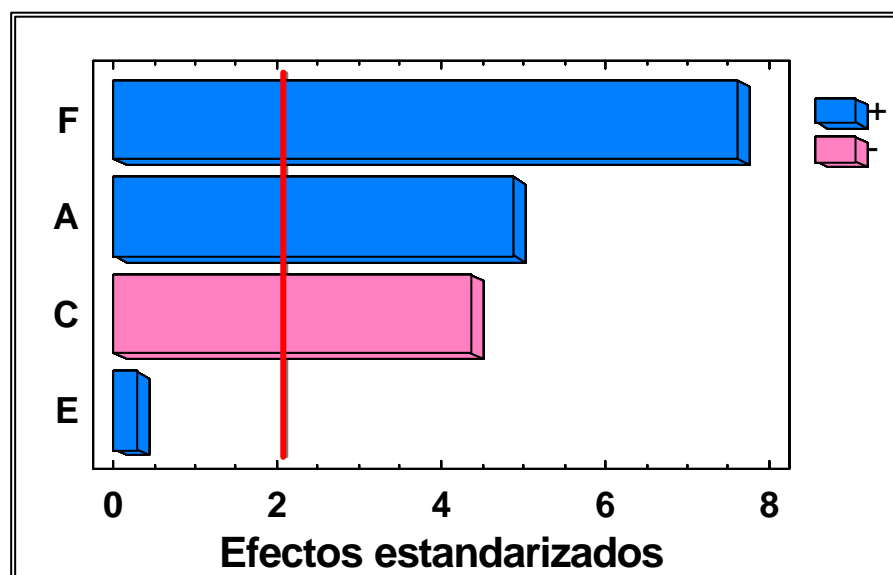


Figura 79 (V).- Preconcentración de hierro. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente

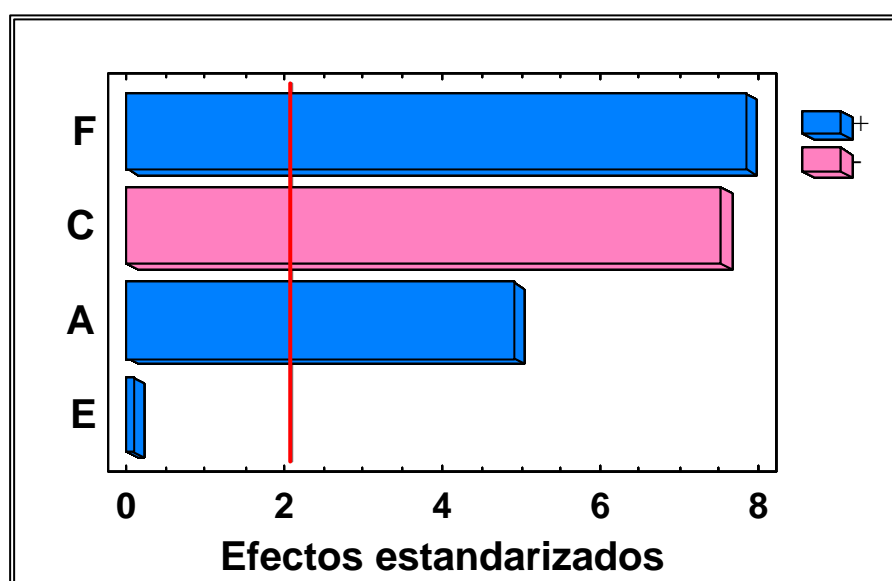


Figura 79 (VI).- Preconcentración de manganeso. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente

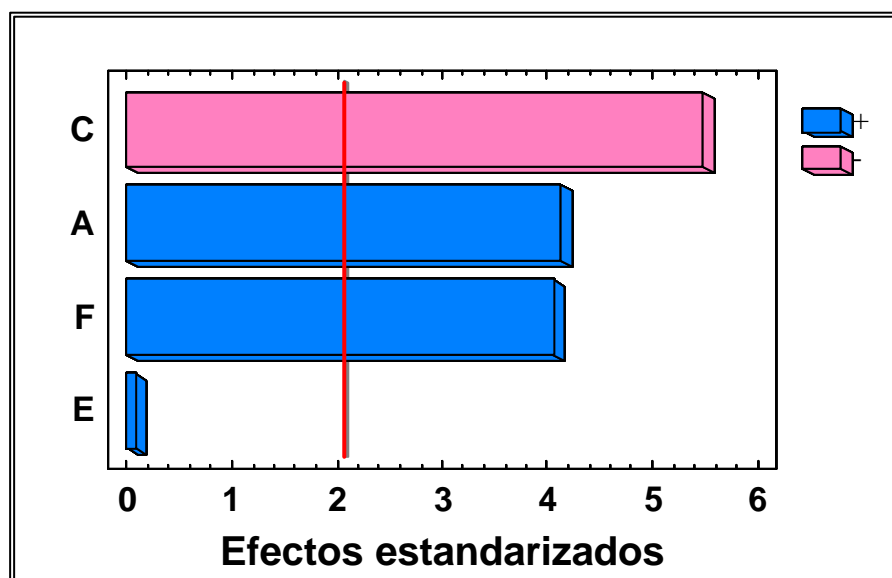


Figura 79 (VII).- Preconcentración de níquel. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente

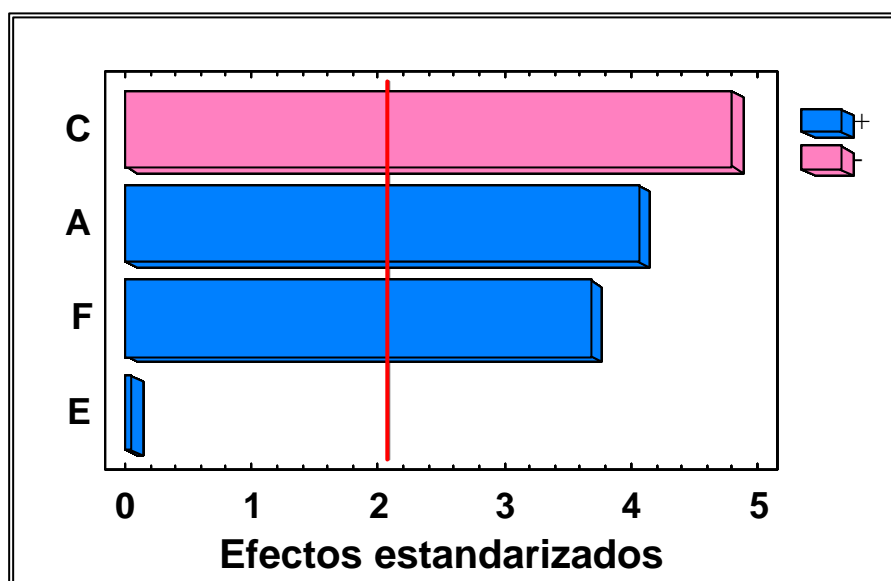


Figura 79 (VIII).- Preconcentración de plomo. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente

Las Figuras 80 (I-VIII) muestran los gráficos de la respuesta (en forma de cubo) obtenidos por el modelo experimental para las variables estudiadas.

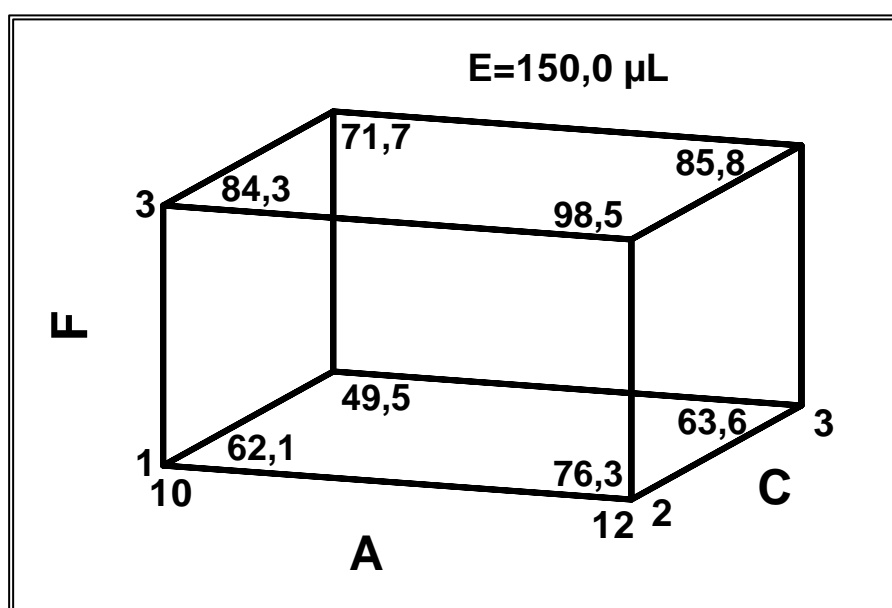


Figura 80 (I).- Preconcentración de cadmio. Gráfico de respuesta para el modelo en forma de cubo. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente

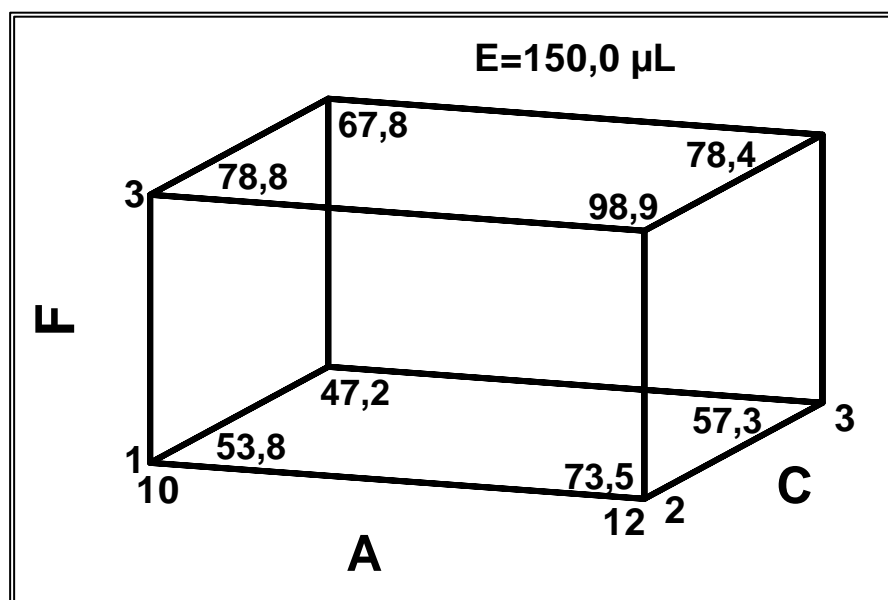


Figura 80 (II).- Preconcentración de cobalto. Gráfico de respuesta para el modelo en forma de cubo. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente



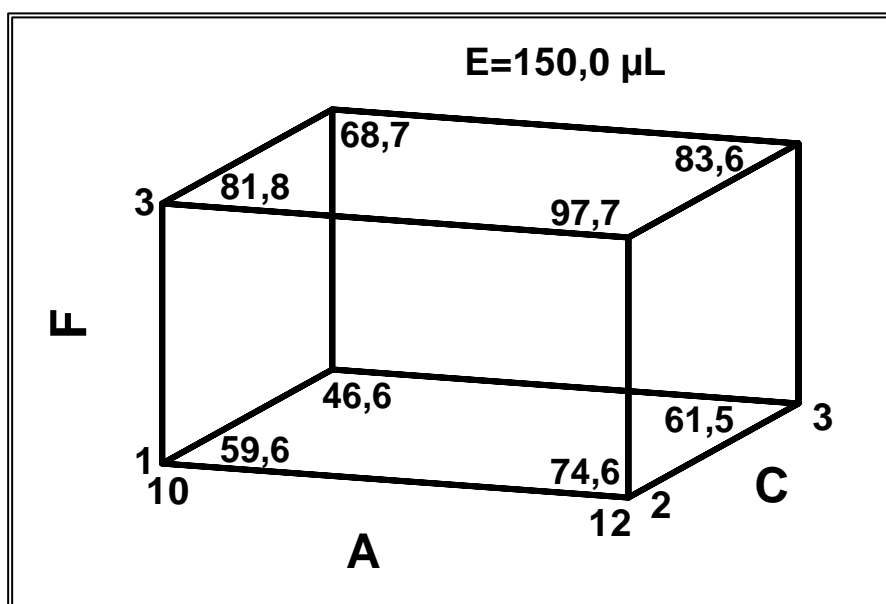


Figura 80 (III).- Preconcentración de cromo. Gráfico de respuesta para el modelo en forma de cubo. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente

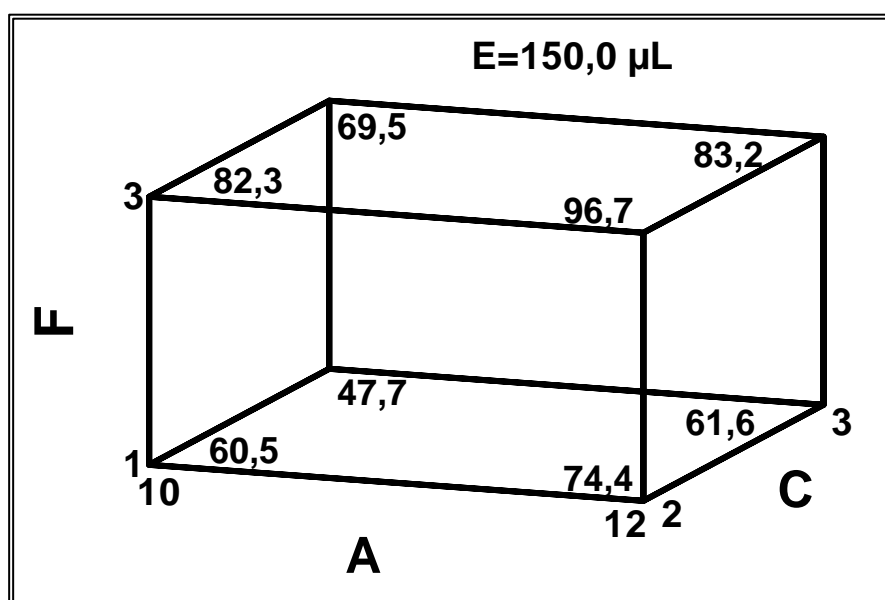


Figura 80 (IV).- Preconcentración de cobre. Gráfico de respuesta para el modelo en forma de cubo. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente

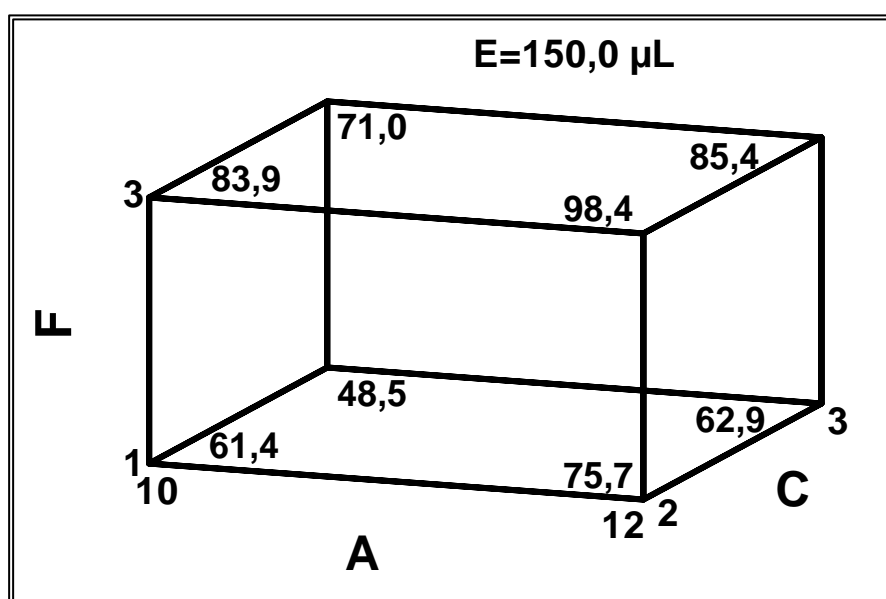


Figura 80 (V).- Preconcentración de hierro. Gráfico de respuesta para el modelo en forma de cubo. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente

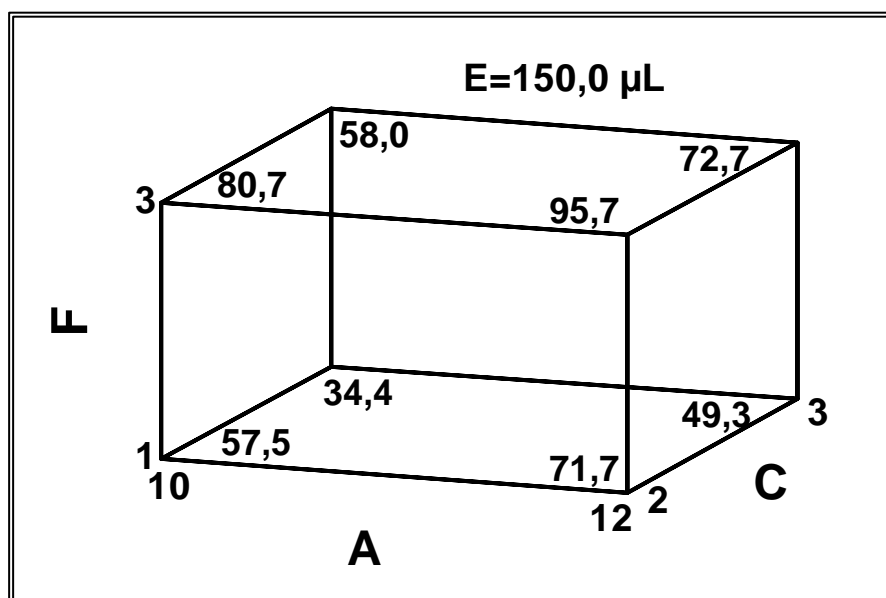


Figura 80 (VI).- Preconcentración de manganeso. Gráfico de respuesta para el modelo en forma de cubo. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente

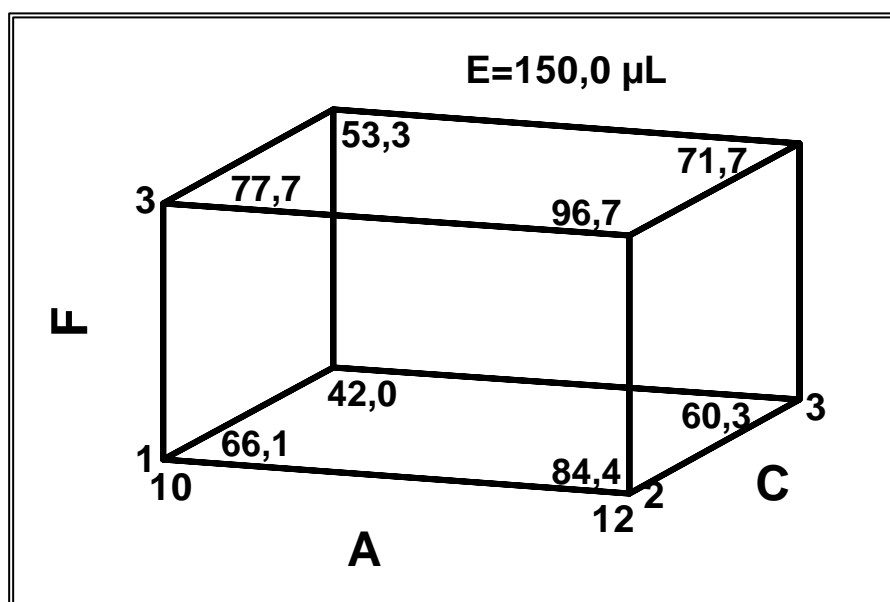


Figura 80 (VII).- Preconcentración de níquel. Gráfico de respuesta para el modelo en forma de cubo. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente

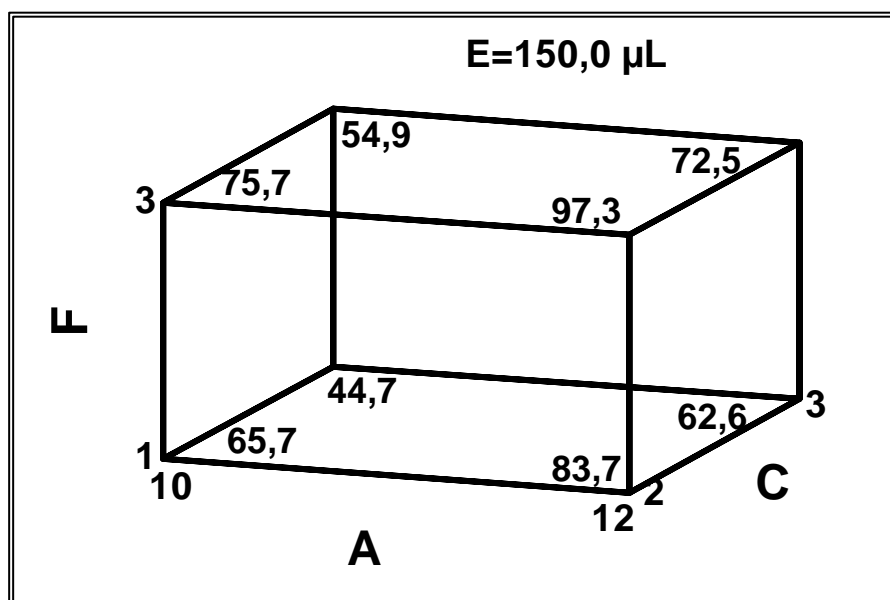


Figura 80 (VIII).- Preconcentración de plomo. Gráfico de respuesta para el modelo en forma de cubo. A, concentración de AA; C, caudal de muestreo; E, volumen de eluyente; F, concentración de eluyente

Los efectos estimados para cada variable se muestran en la Tabla XCVI.

Tabla XCVI.- Efectos estimados para las variables estudiadas

VARIABLE	EFECTO ESTIMADO							
	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb
Concentración de AA	14,2	15,1	15,0	13,9	14,4	14,7	18,2	17,7
Caudal de muestreo	-12,7	-13,6	-13,1	-12,9	-12,9	-22,6	-24,2	-20,9
Volumen de eluyente (HCl)	0,3	0,7	0,3	0,1	0,8	0,2	0,4	0,2
Concentración de eluyente (HCl)	22,1	23,1	22,1	21,8	22,6	23,6	11,2	10,0

Como se puede observar en la Figuras 80 (I-VIII), el % Recuperación es directamente proporcional a la concentración de AA, al volumen de eluyente y a la concentración de eluyente; siendo inversamente proporcional al caudal de muestreo. También, en estas figuras se observa que se obtienen los valores óptimos de las variables dentro de los intervalos de trabajo que previamente se habían fijado. Estos valores óptimos se refieren a un volumen de eluyente de 150  $\mu\text{L}$  (valor medio del intervalo de trabajo elegido para esta variable). Sin embargo, si se observan los experimentos 11, 7, 14, 1, 4, 25, 17 y 21 de la matriz del diseño de cada uno de los metales estudiados, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni y Pb, respectivamente (páginas 339-346), se puede comprobar que se obtienen % Recuperación cuantitativos en todos los casos si el volumen de eluyente es de 110  $\mu\text{L}$  (esta variable tiene poca influencia en la preconcentración de todos los metales en la resina: su efecto estimado es muy pequeño en el intervalo estudiado: 110-190  $\mu\text{L}$ ). Con el objetivo de poder incrementar más la sensibilidad de la metodología analítica se probó la posibilidad de reducir el volumen de eluyente. Sin embargo, si éste se reduce a 90  $\mu\text{L}$ , los % de Recuperación dejan de ser cuantitativos, se reducen de un 10-20%.

Por tanto, los valores óptimos para las variables implicadas en la preconcentración de los metales en la resina quelatante Chelite Che según el diseño central composicional son las que se muestran en la Tabla XCVII.

Tabla XCVII.- Valores óptimos para las variables según cada diseño central composicional

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS							
	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb
Concentración de AA (M)	12	12	12	12	12	12	12	12
Caudal de muestreo (mL/min)	2	2	2	2	2	2	2	2
Volumen de eluyente (HCl) (μL)	110	110	110	110	110	110	110	110
Concentración de eluyente (HCl) (M)	3	3	3	3	3	3	3	3

En la Tabla XCVIII se muestran los valores óptimos de todas las variables implicadas en la preconcentración de los metales en la resina quelatante Chelite Che, llevada a cabo según el dispositivo FIA que aparece reflejado como Figura 74 (p. 310).

Tabla XCVIII.- Valores óptimos de todas las variables implicadas en la preconcentración de los metales en la resina quelatante Chelite Che

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS							
	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb
Concentración de acetato amónico (AA) (M)	12	12	12	12	12	12	12	12
Caudal de la disolución de AA (mL/min)	2	2	2	2	2	2	2	2
Caudal de muestreo (mL/min)	2	2	2	2	2	2	2	2
Longitud del reactor de mezcla (cm)	100	100	100	100	100	100	100	100
Volumen de eluyente (HCl) (μL)	110	110	110	110	110	110	110	110
Concentración de eluyente (HCl) (M)	3	3	3	3	3	3	3	3
Caudal de elución (caudal del agua ultrapura) (mL/min)	4	4	4	4	4	4	4	4

### 3. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA DIGESTIÓN EN LÍNEA DE LA MUESTRA DE ORINA EN EL SISTEMA FIA: DISEÑOS EXPERIMENTALES

Este proceso ha tenido como objetivo conseguir las condiciones óptimas para realizar en línea mediante un sistema FIA:

- La digestión de la muestra de orina haciendo uso de un sistema de flujo interrumpido (stopped-flow).
- Conducción de la muestra de orina digerida al sistema de preconcentración continuo: obtención en línea del pH adecuado al confluir la muestra con un canal de una disolución de acetato amónico, y posterior retención de los metales en la resina quelatante Chelite Che contenida en una minicolumna.
- Elución de los metales en medio ácido y detección continua por FAAS.

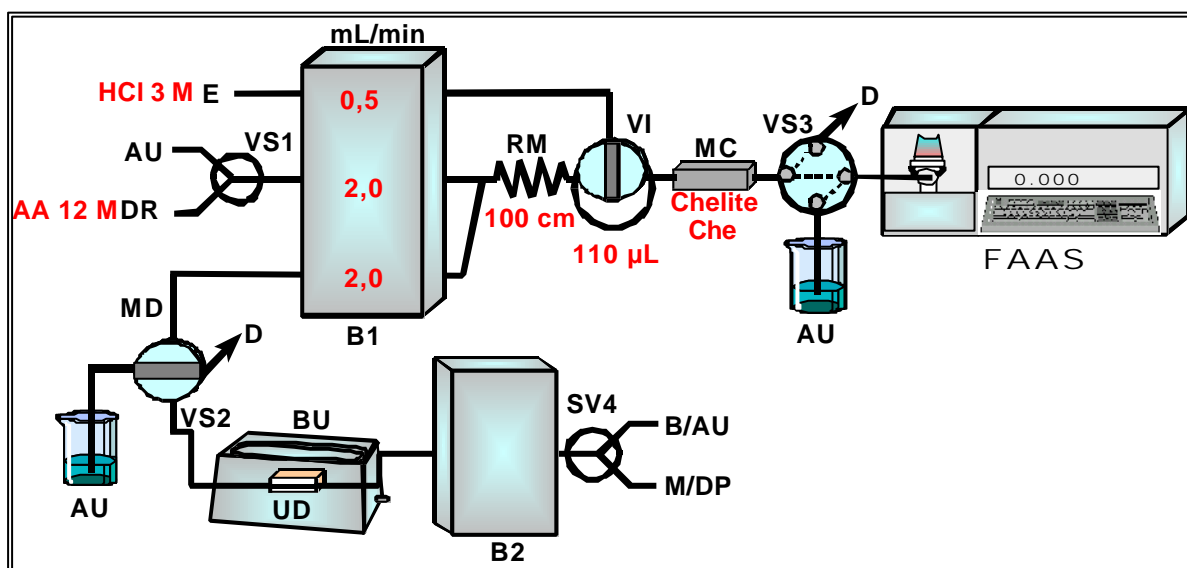


Figura 81.- Sistema FIA usado para la determinación metales en muestras de orina. E, eluyente (HCl 3 M); AU, agua ultrapura; DR, disolución reguladora (acetato amónico 12 M); RM, reactor de mezcla; D, desecho; B1 y B2, bombas peristálticas; VS1, VS2, VS3 y VS4 válvulas de selección; VI, válvula de inyección; MC, minicolumna conteniendo la resina quelatante Chelite Che; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama; MD, muestra de orina digerida; BU, baño de ultrasonidos; UD, módulo de digestión; B, blanco; M/DP, muestra/disolución patrón

Como se puede observar en la Figura 81, el sistema de preconcentración de los metales optimizado previamente forma parte del sistema FIA utilizado para la determinación de metales en muestras de orina.

El *dispositivo de digestión en línea* hace uso de un módulo de digestión (UD) (Figura 82). Este módulo de digestión es una minicolumna de vidrio borosilicatado químicamente inerte (OMNIFIT) de 15 mm de diámetro interno y 100 mm de longitud con dos terminales fijos y 12 mL de volumen de lecho.



Figura 82.- Módulo de digestión

Este módulo se inserta en el sistema FIA y se introduce en el baño de ultrasonidos (BU) (Figura 83) para que el proceso de digestión se realice bajo la acción de la energía de ultrasonidos.

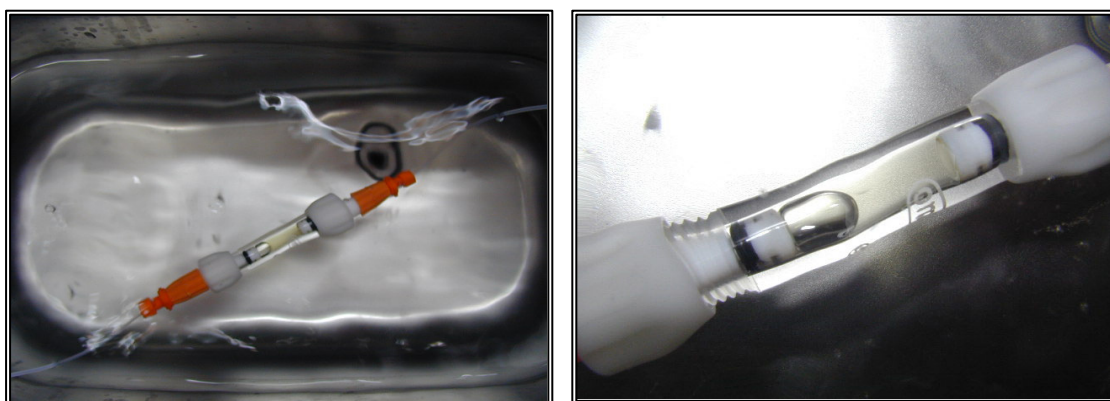


Figura 83.- Módulo de digestión bajo la acción de la energía de ultrasonidos

La muestra de orina (a la que previamente se le ha añadido ácido nítrico concentrado) se introduce en el sistema mediante el uso de una bomba peristáltica (B2). Cuando todo el volumen de muestra que se desea introducir en el sistema llega al módulo de digestión (UD) (situado en el interior del baño



de ultrasonidos), se para el flujo deteniendo el funcionamiento de la B2. En ese momento comienza la digestión de la muestra bajo la acción de la energía de ultrasonidos, la cual se realizará a una temperatura y en un tiempo determinados. Mientras, al detector le llega agua ultrapura. Una vez se ha realizado el proceso de digestión, la muestra digerida (MD) entra en el sistema de preconcentración al girar la VS2. En ese momento, la MD confluye con un canal de disolución reguladora y ambos canales se homogenizan en el reactor de mezcla (RM). Así se consigue adaptar el pH de la muestra a las condiciones óptimas de retención. Una vez que la muestra haya pasado por la resina, se gira la válvula de inyección (VI) para inyectar el eluyente (110 µL de una disolución 3 M de HCl) sobre un líquido portador (agua ultrapura). Una vez eluidos, los metales son conducidos de manera continua hacia el detector (espectrofotómetro de absorción atómica con llama).

### 3.1. Diseño Experimental: Superficie de respuesta

Las variables a optimizar fueron tres:

- ❖ Temperatura de digestión
- ❖ Tiempo de sonicación (flujo interrumpido)
- ❖ Concentración de  $\text{HNO}_3$  en la muestra

Como el número de variables que afectan al proceso de digestión no es muy elevado, y dado que el número de experimentos que establece un diseño de superficie de respuesta Central Composicional  $2^3 +$  estrella para encontrar los valores óptimos de estas variables no es demasiado elevado (dieciséis experimentos), no se utilizó un diseño de screening para realizar la evaluación inicial de las variables.

Los valores máximos y mínimos para estas variables fueron seleccionados en función de experimentos realizados en estudios previos (XCIX).

Tabla XCIX.- Variables y niveles considerados para el diseño factorial de superficie de respuesta central composicional  $2^3 + \text{estrella}$

VARIABLE	CLAVE	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
Temperatura de digestión	A	20 °C	70 °C
Tiempo de sonicación (flujo interrumpido)	B	1 min	5 min
Concentración de HNO <sub>3</sub> en la muestra	C	1 M	4 M

El diseño factorial aplicado de superficie de respuesta es un diseño central composicional  $2^3 + \text{estrella}$  que implica realizar 16 experimentos (Statgraphics Plus 5.1). Las características del diseño son las siguientes:

- Tipo de Diseño: Superficie de respuesta
- Nombre del Diseño: Central Composicional  $2^3 + \text{estrella}$
- Características del diseño: ortogonal
- Número de factores experimentales: 3
- Puntos centrales: 2
- Número de experimentos: 16
- Error grados de libertad: 6
- Aleatorio: Si
- Distancia axial,  $\alpha = 1,28719$

Una vez obtenida la matriz del diseño, se realizaron los experimentos fijados por la misma para después introducir los resultados obtenidos y obtener la información necesaria para conseguir los valores óptimos de cada variable.

El diseño factorial se aplicó a una muestra de orina (de un trabajador expuesto a humos de soldadura). En esta muestra se determinó previamente la concentración de los metales por un método de referencia (basado en una digestión ácida convencional con ácido nítrico concentrado [227] y medida continua de los metales por FAAS mediante el dispositivo FIA optimizado

previamente). Los resultados de la determinación de los metales en la muestra de orina por el método de referencia aparecen en la Tabla C.

Tabla C.- Concentración de los metales en una muestra de orina obtenidas por el método de referencia

	Volumen de muestra analizada (mL)	Concentración media $\pm$ desviación estándar, $\mu\text{g/L}$ (n=6)	CV <sup>1</sup> (%)
Cd	9	1,0 $\pm$ 0,1	10,0
Co	9	3,6 $\pm$ 0,2	5,6
Cr	5	14,4 $\pm$ 0,6	4,2
Cu	5	39,7 $\pm$ 1,2	3,0
Fe	2,5	180,0 $\pm$ 8,0	4,4
Mn	2,5	19,1 $\pm$ 1,0	5,2
Ni	5	15,9 $\pm$ 0,8	5,0
Pb	5	49,9 $\pm$ 1,9	3,8

<sup>1</sup>CV (coeficiente de variación)

La variable respuesta (% Recuperación) se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{A}{B} \times 100$$

Siendo:

A: concentración de metal obtenida por el método propuesto

B: concentración de metal obtenida por el método de referencia

Los % de Recuperación obtenidos por triplicado, expresados como la media de los valores calculados obtenidos para cada experimento del diseño y utilizando los mismos volúmenes de muestra que los utilizados en la digestión ácida convencional (Tabla C) se muestran en la Tabla CI.

Tabla CI (1).- Matriz del diseño central composicional  $2^3 +$  estrella para las tres variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la determinación de cadmio en orina

Experimento	A	B	C	% Recuperación
1	20,0	5,0	4,0	100,7
2	20,0	1,0	1,0	60,7
3	70,0	5,0	1,0	75,9
4	20,0	5,0	1,0	68,3
5	77,1797	3,0	2,5	80,5
6	20,0	1,0	4,0	77,1
7	70,0	1,0	1,0	64,0
8	45,0	5,57438	2,5	80,5
9	70,0	5,0	4,0	98,3
10	45,0	3,0	2,5	75,9
11	45,0	0,425623	2,5	64,0
12	12,8203	3,0	2,5	80,5
13	45,0	3,0	2,5	85,8
14	45,0	3,0	0,569217	71,0
15	45,0	3,0	4,43078	98,3
16	70,0	1,0	4,0	71,0

Tabla CI (2).- Matriz del diseño central composicional  $2^3 +$  estrella para las tres variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la determinación de cobalto en orina

Experimento	A	B	C	% Recuperación
1	45,0	3,0	4,43078	98,8
2	12,8203	3,0	2,5	77,1
3	45,0	5,57438	2,5	80,5
4	20,0	5,0	1,0	77,1
5	70,0	1,0	1,0	64,7
6	20,0	1,0	4,0	77,1
7	70,0	1,0	4,0	71,0
8	20,0	5,0	4,0	98,8
9	70,0	5,0	1,0	77,1
10	45,0	3,0	2,5	85,8
11	70,0	5,0	4,0	101,5
12	45,0	0,425623	2,5	64,7
13	45,0	3,0	2,5	77,1
14	45,0	3,0	0,569217	71,0
15	20,0	1,0	1,0	64,7
16	77,1797	3,0	2,5	80,5

Tabla CI (3).- Matriz del diseño central composicional  $2^3 +$  estrella para las tres variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la determinación de cromo en orina

Experimento	A	B	C	% Recuperación
1	70,0	5,0	1,0	79,0
2	20,0	1,0	1,0	63,8
3	70,0	1,0	1,0	67,1
4	45,0	3,0	2,5	79,0
5	20,0	5,0	4,0	101,3
6	20,0	1,0	4,0	86,2
7	70,0	1,0	4,0	74,1
8	45,0	5,57438	2,5	88,4
9	70,0	5,0	4,0	97,4
10	12,8203	3,0	2,5	79,0
11	45,0	3,0	0,569217	76,8
12	45,0	0,425623	2,5	67,1
13	20,0	5,0	1,0	71,4
14	77,1797	3,0	2,5	88,4
15	45,0	3,0	2,5	88,4
16	45,0	3,0	4,43078	99,0

Tabla CI (4).- Matriz del diseño central composicional  $2^3 +$  estrella para las tres variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la determinación de cobre en orina

Experimento	A	B	C	% Recuperación
1	12,8203	3,0	2,5	68,3
2	20,0	1,0	1,0	68,3
3	77,1797	3,0	2,5	75,5
4	20,0	5,0	1,0	68,3
5	70,0	5,0	1,0	68,3
6	45,0	0,425623	2,5	68,3
7	70,0	1,0	4,0	68,3
8	45,0	3,0	2,5	80,6
9	45,0	5,57438	2,5	75,5
10	70,0	1,0	1,0	68,3
11	20,0	1,0	4,0	72,5
12	20,0	5,0	4,0	101,7
13	45,0	3,0	4,43078	97,9
14	45,0	3,0	0,569217	68,3
15	70,0	5,0	4,0	97,9
16	45,0	3,0	2,5	75,5

Tabla CI (5).- Matriz del diseño central composicional  $2^3 +$  estrella para las tres variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la determinación de hierro en orina

Experimento	A	B	C	% Recuperación
1	45,0	3,0	2,5	72,4
2	45,0	3,0	4,43078	99,5
3	70,0	1,0	1,0	62,0
4	20,0	5,0	1,0	66,3
5	70,0	5,0	1,0	77,5
6	20,0	1,0	4,0	75,1
7	20,0	5,0	4,0	104,4
8	45,0	3,0	0,569217	68,0
9	77,1797	3,0	2,5	77,5
10	12,8203	3,0	2,5	77,5
11	45,0	3,0	2,5	87,8
12	45,0	5,57438	2,5	77,5
13	20,0	1,0	1,0	58,2
14	70,0	5,0	4,0	99,5
15	70,0	1,0	4,0	68,0
16	45,0	0,425623	2,5	60,0

Tabla CI (6).- Matriz del diseño central composicional  $2^3 +$  estrella para las tres variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la determinación de manganeso en orina

Experimento	A	B	C	% Recuperación
1	45,0	3,0	2,5	89,8
2	20,0	1,0	1,0	70,8
3	45,0	3,0	4,43078	98,9
4	20,0	5,0	1,0	68,3
5	12,8203	3,0	2,5	66,5
6	20,0	1,0	4,0	78,9
7	70,0	1,0	4,0	78,9
8	77,1797	3,0	2,5	70,8
9	70,0	5,0	4,0	98,9
10	70,0	1,0	1,0	70,8
11	45,0	0,425623	2,5	68,3
12	70,0	5,0	1,0	78,9
13	45,0	5,57438	2,5	86,1
14	20,0	5,0	4,0	101,7
15	45,0	3,0	2,5	78,9
16	45,0	3,0	0,569217	66,5

Tabla CI (7).- Matriz del diseño central composicional  $2^3 +$  estrella para las tres variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la determinación de níquel en orina

Experimento	A	B	C	% Recuperación
1	45,0	3,0	2,5	88,8
2	70,0	1,0	4,0	73,7
3	45,0	3,0	0,569217	73,7
4	45,0	5,57438	2,5	79,9
5	45,0	0,425623	2,5	66,8
6	77,1797	3,0	2,5	85,2
7	12,8203	3,0	2,5	79,9
8	70,0	5,0	4,0	100,1
9	20,0	5,0	4,0	103,0
10	45,0	3,0	4,43078	100,1
11	20,0	1,0	4,0	85,2
12	70,0	5,0	1,0	79,9
13	20,0	5,0	1,0	71,1
14	70,0	1,0	1,0	66,8
15	20,0	1,0	1,0	63,5
16	45,0	3,0	2,5	79,9

Tabla CI (8).- Matriz del diseño central composicional  $2^3 +$  estrella para las tres variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la determinación de plomo en orina

Experimento	A	B	C	% Recuperación
1	70,0	1,0	1,0	69,6
2	45,0	5,57438	2,5	76,8
3	20,0	1,0	1,0	69,6
4	45,0	3,0	4,43078	99,7
5	70,0	5,0	1,0	69,6
6	20,0	5,0	4,0	100,0
7	20,0	1,0	4,0	76,8
8	20,0	5,0	1,0	69,6
9	70,0	1,0	4,0	69,6
10	45,0	0,425623	2,5	58,1
11	77,1797	3,0	2,5	76,8
12	70,0	5,0	4,0	99,7
13	12,8203	3,0	2,5	69,6
14	45,0	3,0	2,5	82,7
15	45,0	3,0	2,5	76,8
16	45,0	3,0	0,569217	69,6

### 3.1.1.- Conclusiones del diseño de superficie de respuesta

El análisis de los resultados de las Tablas CI (1-8) da lugar a las Cartas Pareto que se muestran en las Figuras 84 (I-VIII). Como se puede observar, en ninguno de los casos la temperatura de digestión es una variable estadísticamente significativa y aunque positivo, siempre presenta un efecto estimado muy pequeño. Sin embargo, el tiempo de sonicación (flujo interrumpido) y la concentración de  $\text{HNO}_3$  en la muestra son variables estadísticamente significativas con un efecto estimado positivo, es decir, el % de Recuperación es directamente proporcional al valor de ambas variables.

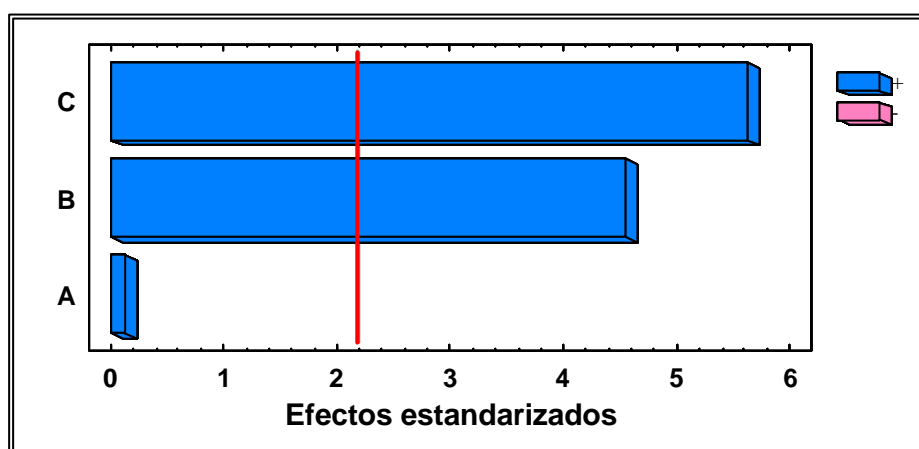


Figura 84 (I).- Determinación de cadmio en orina. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, temperatura de digestión; B, tiempo de sonicación (flujo interrumpido); C, concentración de  $\text{HNO}_3$  en la muestra

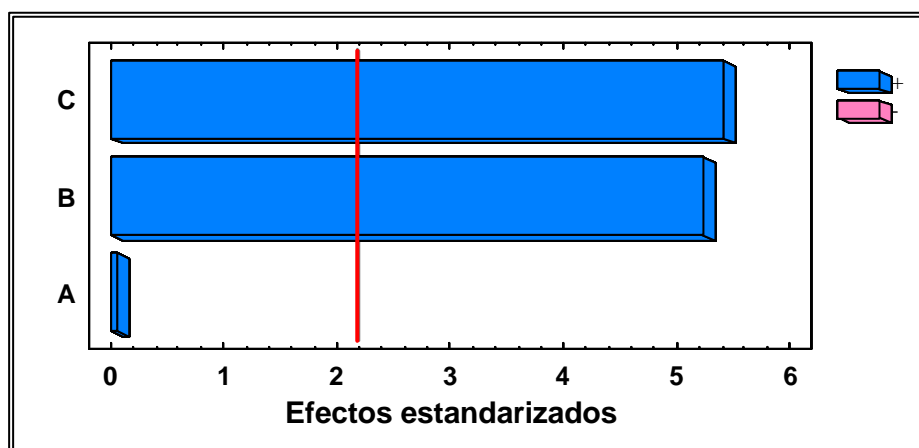


Figura 84 (II).- Determinación de cobalto en orina. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, temperatura de digestión; B, tiempo de sonicación (flujo interrumpido); C, concentración de  $\text{HNO}_3$  en la muestra



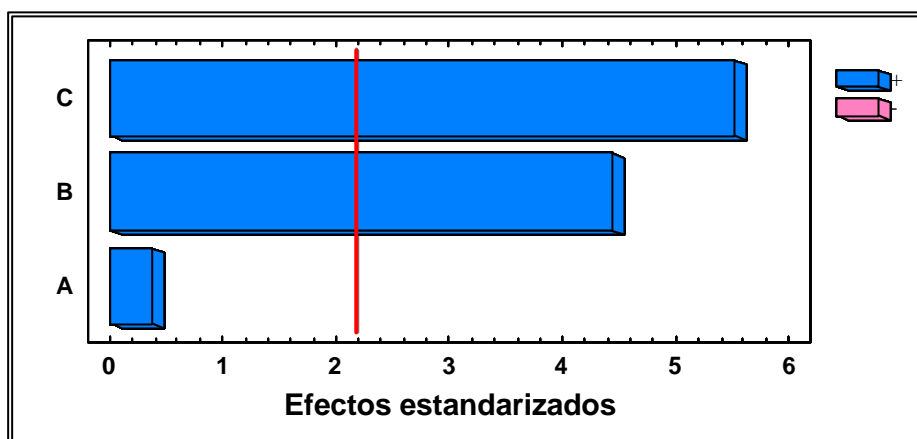


Figura 84 (III).- Determinación de cromo en orina. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, temperatura de digestión; B, tiempo de sonicación (flujo interrumpido); C, concentración de  $\text{HNO}_3$  en la muestra

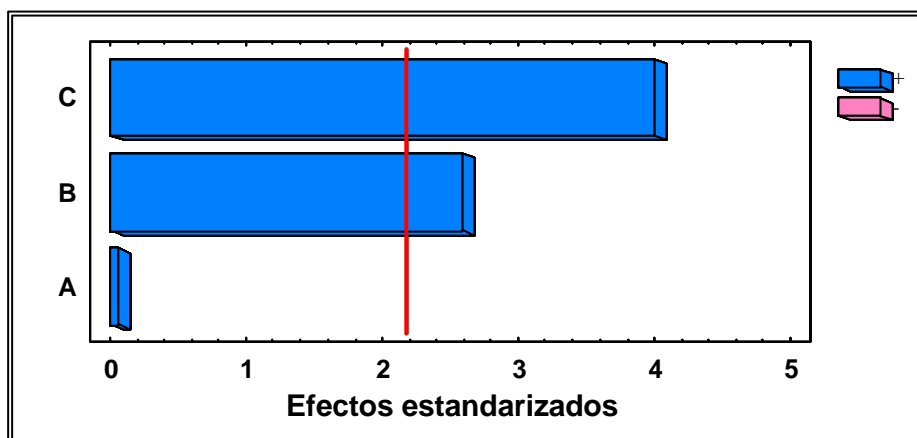


Figura 84 (IV).- Determinación de cobre en orina. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, temperatura de digestión; B, tiempo de sonicación (flujo interrumpido); C, concentración de  $\text{HNO}_3$  en la muestra

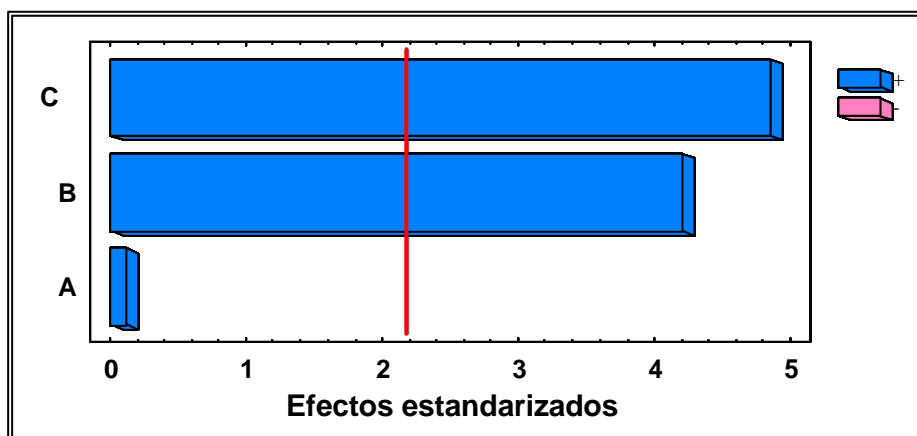


Figura 84 (V).- Determinación de hierro en orina. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, temperatura de digestión; B, tiempo de sonicación (flujo interrumpido); C, concentración de  $\text{HNO}_3$  en la muestra

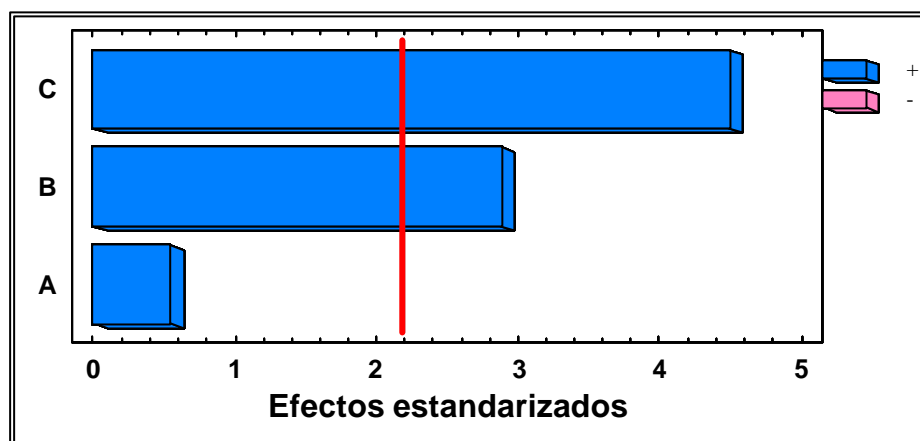


Figura 84 (VI).- Determinación de manganeso en orina. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, temperatura de digestión; B, tiempo de sonicación (flujo interrumpido); C, concentración de  $\text{HNO}_3$  en la muestra

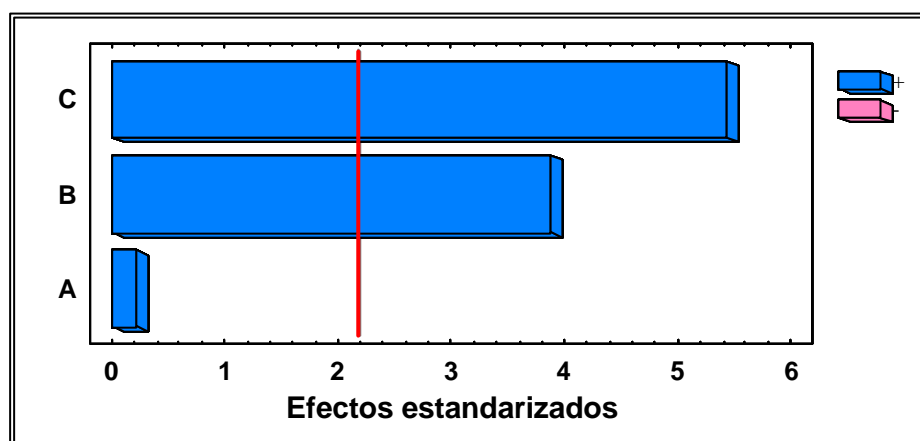


Figura 84 (VII).- Determinación de níquel en orina. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, temperatura de digestión; B, tiempo de sonicación (flujo interrumpido); C, concentración de  $\text{HNO}_3$  en la muestra

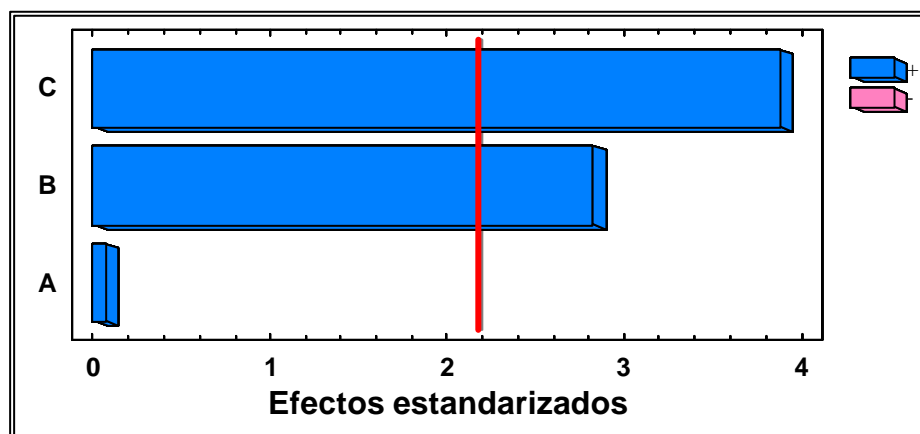
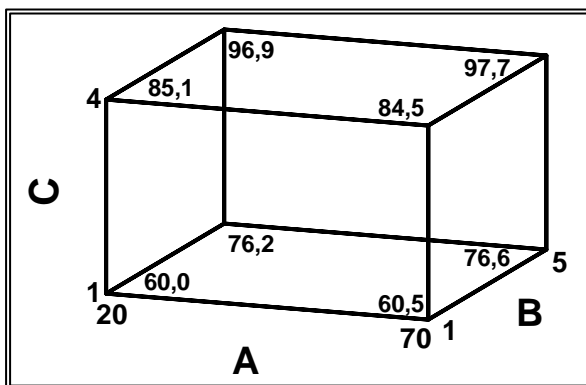
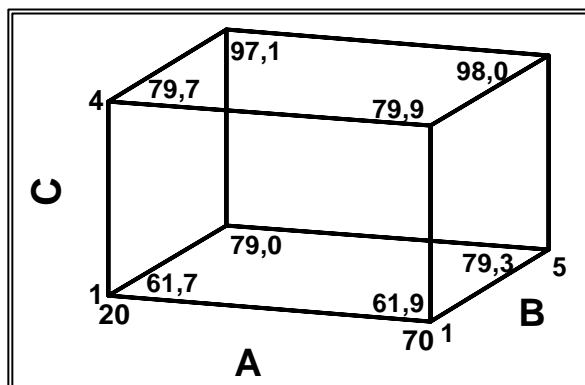


Figura 84 (VIII).- Determinación de plomo en orina. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial. A, temperatura de digestión; B, tiempo de sonicación (flujo interrumpido); C, concentración de  $\text{HNO}_3$  en la muestra

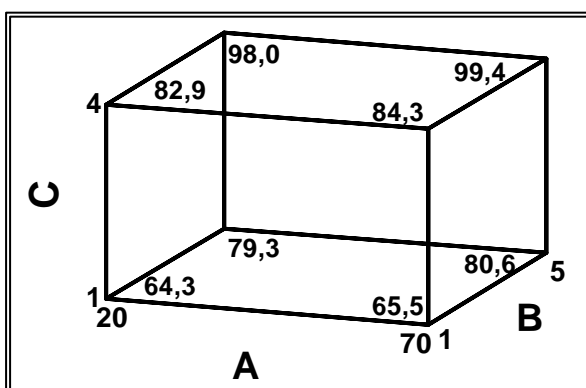
Las Figuras 85 (I-VIII) muestran los gráficos de respuesta (en forma de cubo) para el modelo experimental para las variables estudiadas: A, temperatura de digestión; B, tiempo de sonicación (flujo interrumpido); C, concentración de  $\text{HNO}_3$  en la muestra.



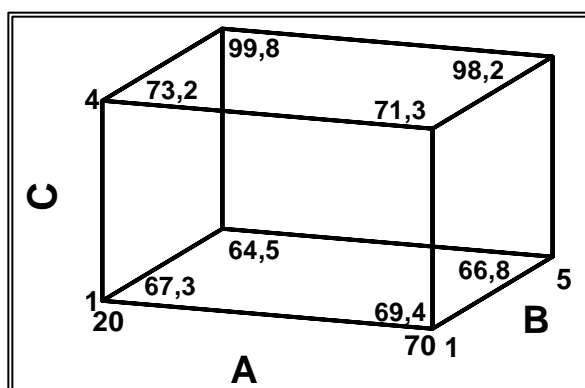
(I)



(II)



(III)



(IV)

Figura 85 (I-IV).- Gráficos de respuesta para el modelo en forma de cubo proporcionados por el diseño factorial. A, temperatura de digestión; B, tiempo de sonicación (flujo interrumpido); C, concentración de  $\text{HNO}_3$  en la muestra. (I) Cd; (II) Co; (III) Cr; (IV) Cu

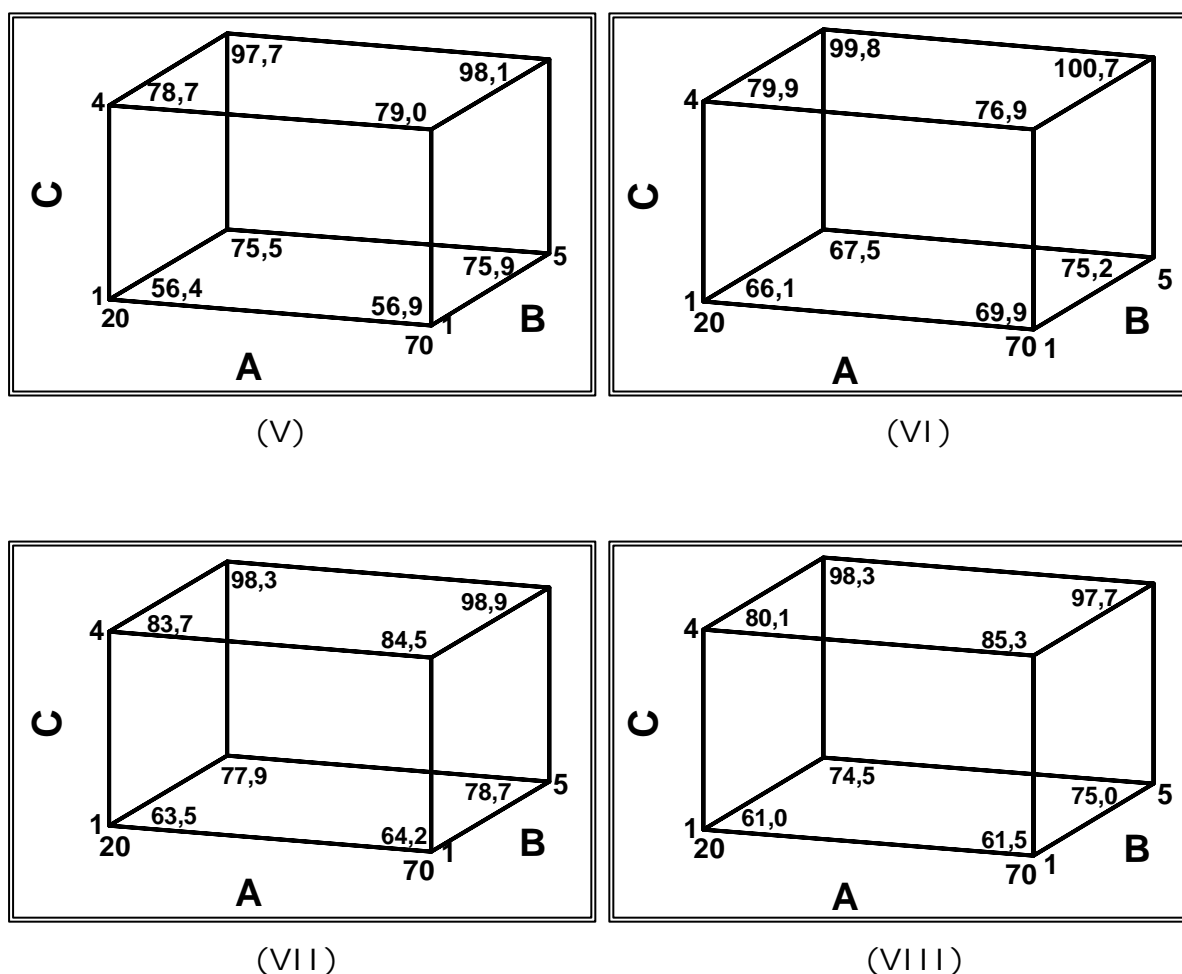


Figura 85 (V-VIII).- Gráficos de respuesta para el modelo en forma de cubo proporcionados por el diseño factorial. A, temperatura de digestión; B, tiempo de sonicación (flujo interrumpido); C, concentración de HNO<sub>3</sub> en la muestra. (V) Fe; (VI) Mn; (VII) Ni; (VIII) Pb

A la vista de los gráficos de respuesta (Figuras 85 (I-VIII)), se escogen los valores óptimos de las variables dentro de los intervalos de trabajo que previamente se habían fijado. Estos valores óptimos son:

- A, temperatura de digestión: Una temperatura de 20 °C (temperatura ambiente) sería suficiente para digerir la muestra de orina (según los % de Recuperación obtenidos en los experimentos nº 1, 8, 5, 12, 7, 14, 9 y 6 de las Tablas CI (1-8), respectivamente.

- B, tiempo de sonicación (flujo interrumpido): Según los experimentos n° 1, 8, 5, 12, 7, 14, 9 y 6 de las Tablas CI (1-8), respectivamente, si la temperatura de digestión es 20 °C, y si la muestra se encuentra en un medio 4 M de ácido nítrico se obtienen % de Recuperación cuantitativos cuando el tiempo de sonicación es de 5 min. Sin embargo, también según los experimentos n° 15, 1, 16, 13, 2,3, 10 y 14 de las Tablas CI (1-8), respectivamente, se obtienen % de Recuperación cuantitativos cuando el tiempo de sonicación es de 3 min.
- C, concentración de HNO<sub>3</sub> en la muestra: Según los experimentos n° 1, 8, 5, 12, 7, 14, 9 y 6 de las Tablas CI (1-8), respectivamente, si la temperatura de digestión es 20 °C, cuando el tiempo de sonicación es de 5 min y si la muestra se encuentra en un medio 4 M de ácido nítrico se obtienen % de Recuperación cuantitativos.

Así, con el objetivo de estudiar si era posible realizar la digestión de la muestra de orina en 3 min a 20 °C (temperatura ambiente) y manteniendo la muestra de orina en un medio ácido nítrico 4 M, se realizaron experimentos fuera del marco del diseño. De esta forma, se comprobó que para la determinación de todos los metales se obtuvieron % Recuperación cuantitativos (96,3; 97,0; 97,8; 100,7; 97,5; 98,3; 97,7 y 98,0%, para Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni y Pb, respectivamente).

En resumen, los valores óptimos de las variables implicadas en la digestión en línea de la muestra de orina en el sistema FIA propuesto son las que se muestran en la Tabla CII.

Tabla CII.- Valores óptimos para las variables implicadas en la digestión en línea de la muestra de orina

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS
Temperatura de digestión(°C)	20
Tiempo de sonicación (flujo interrumpido) (min)	3
Concentración de HNO <sub>3</sub> en la muestra (M)	4

#### 4.- MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE CADMIO, COBALTO, CROMO, COBRE, HIERRO, MANGANESO, NÍQUEL Y PLOMO EN ORINA

##### 4.1.- Aparatos, Instrumentación Analítica y Reactivos

###### *Aparatos e Instrumentación Analítica*

Ver página 106 y páginas 308-309. Las condiciones de medida para los metales en el espectrofotómetro de absorción atómica con llama se muestran en la Tabla XXVI (página 154).

###### *Reactivos*

Ver página 107 y páginas 308-309.

##### 4.2.- Procedimiento para la determinación de cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel y plomo en orina

El esquema de trabajo del método optimizado para la determinación de cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel y plomo en orina se basa en tres etapas:

1) En una primera etapa se realiza la digestión ácida de la muestra de orina. La muestra de orina (2,5-9 mL, dependiendo del metal) a la que previamente se le ha añadido ácido nítrico concentrado de manera que resulte una concentración final 4 M en ácido nítrico se introduce en el sistema mediante el uso de una bomba peristáltica (B2) a 7 mL/min. Cuando toda la muestra introducida en el sistema llega al módulo de digestión (UD) (situado en el interior del baño de ultrasonidos), se para el flujo deteniendo el funcionamiento de la B2 durante 3 min. En ese momento comienza la digestión de la muestra bajo la acción de la energía de ultrasonidos, la cual se realiza a temperatura ambiente. Mientras, al detector le llega agua ultrapura.

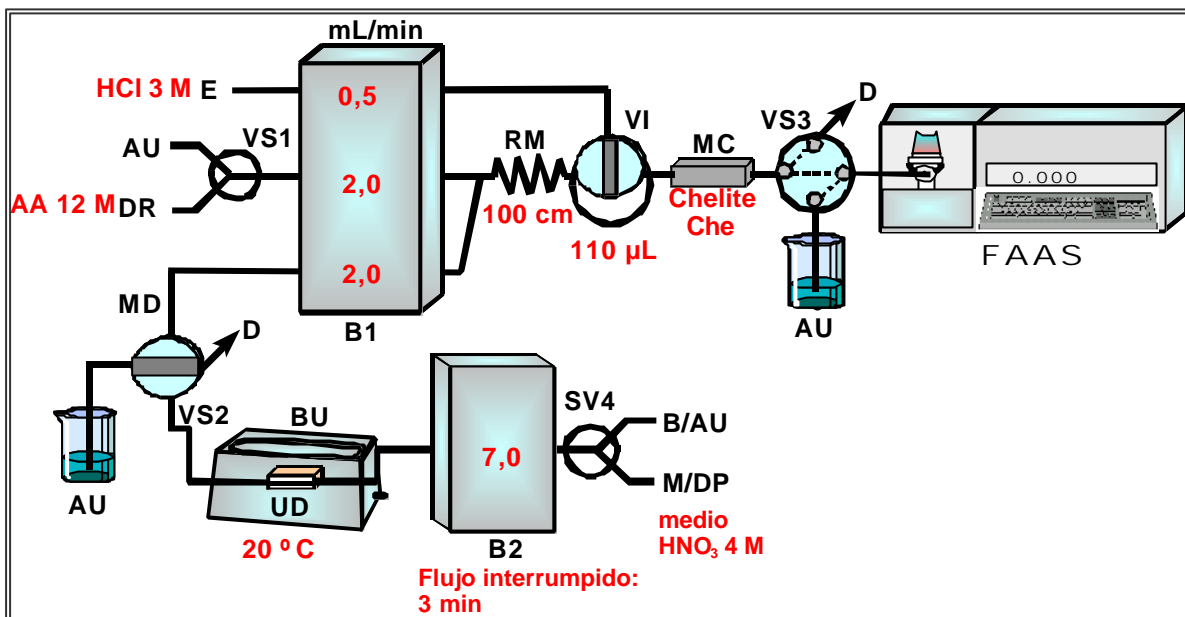


Figura 86.- Sistema FIA usado para la determinación de cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel y plomo en orina. E, eluyente (HCl 3 M); AU, agua ultrapura; DR, disolución reguladora (acetato amónico 12 M); RM, reactor de mezcla; D, desecho; B1 y B2, bombas peristálticas; VS1, VS2, VS3 y VS4 válvulas de selección; VI, válvula de inyección; MC, minicolumna conteniendo la resina quelatante Chelite Che; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama; MD, muestra de orina digerida; BU, baño de ultrasonidos; UD, módulo de digestión; B, blanco; M/DP, muestra/disolución patrón

2) Transcurrida la digestión de la muestra de orina, se gira la válvula de selección (VS2) de modo que la muestra digerida (MD) pasa a la parte del sistema FIA que lo conducirá al sistema de preconcentración (Figura 86). En ese momento, la MD confluye con un canal de disolución reguladora y ambos canales se homogenizan en el reactor de mezcla (RM). Así se consigue adaptar el pH de la muestra a las condiciones óptimas de retención de los metales en la resina quelatante Chelite Che. De esta forma, la matriz de la muestra va al desecho y al detector le llega agua ultrapura.

3) Una vez que la muestra haya pasado por la resina, se gira la válvula de inyección (VI) para inyectar el eluyente (110  $\mu$ L de una disolución 3 M de HCl) sobre un líquido portador (agua ultrapura). Una vez eluidos, los metales son conducidos de manera continua hacia el detector (espectrofotómetro de absorción atómica con llama).

Para realizar la recta de calibrado se introducen secuencialmente en el sistema FIA disoluciones patrón (DP) de distintas concentraciones de cada metal (preparadas en ácido nítrico 4 M). El blanco es una disolución 4 M de ácido nítrico.

En el siguiente esquema se muestra el funcionamiento del sistema FIA mostrado en la Figura 86 con respecto a la actuación de las válvulas de selección de inyección y bombas peristálticas.

	Introducción de B	Introducción de M/DP	Etapas de digestión	Etapas de preconcentración	Etapas de elución/detección
	<b>CANAL SELECCIONADO</b>				
VS1	AU	AU	AU	DR	AU
VS2	AU	AU	AU	MD	AU
VS3	AU	AU	AU	AU	MC
VS4	B	M/DP	-	-	-
	<b>POSICIÓN/ACTUACIÓN DEL DISPOSITIVO</b>				
VI	CARGA	CARGA	CARGA	CARGA	INYECCIÓN
B1	ENCENDIDA	ENCENDIDA	ENCENDIDA	ENCENDIDA	ENCENDIDA
B2	ENCENDIDA	ENCENDIDA	PARADA	PARADA	PARADA

VS1, VS2, VS3 y VS4 válvulas de selección; VI, válvula de inyección; B1 y B2, bombas peristálticas; AU, agua ultrapura; B, blanco; M/DP, muestra/disolución patrón; DR, disolución reguladora; MD, muestra de orina digerida; MC, canal que sale de la minicolumna conteniendo la resina quelatante Chelate Che



## 5.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE ORINA

Se evaluaron las características analíticas del método desarrollado para la determinación de metales en muestras de orina de trabajadores expuestos a contaminación metálica (humos de soldadura), calculando los límites de detección y cuantificación, la sensibilidad, el intervalo lineal, la precisión y la exactitud. Además, se estudió el efecto matriz comparando las rectas de calibrado y adición, y se determinó la frecuencia de muestreo.

### 5.1. Rectas de Calibrado

Se realizó el calibrado correspondiente a cada metal usando el sistema FIA propuesto con disoluciones patrón de cada metal preparadas en ácido nítrico 4 M (Figuras 87 (I-VIII)). La concentración y el volumen introducido de cada disolución patrón se muestran en la Tabla CIII

Tabla CIII.- Características de las disoluciones patrón de los distintos metales utilizadas para trazar la recta de calibrado

	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb
Intervalo de concentración utilizado ( $\mu\text{g/L}$ )	0-20	0-35	0-100	0-100	0-210	0-50	0-50	0-200
Volumen de muestra introducido en el sistema FIA (mL)	9,0	9,0	5,0	5,0	2,5	2,5	5,0	5,0

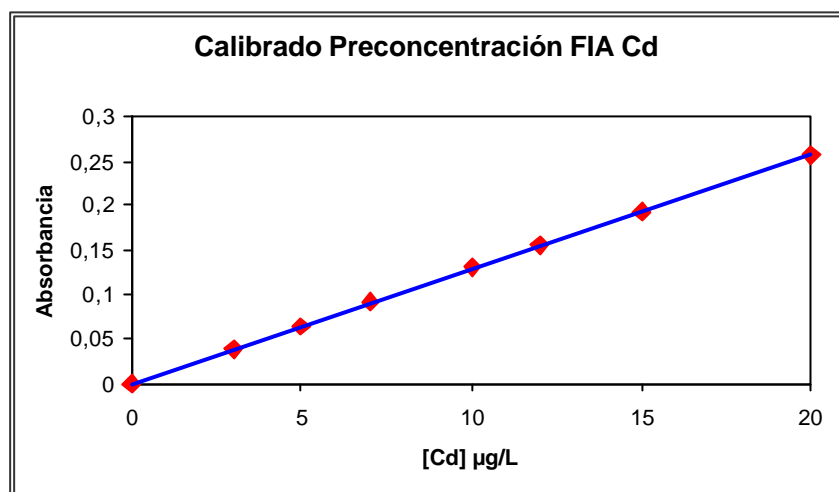


Figura 87 (I).- Calibrado FIA para la preconcentración de cadmio

$$A = 1,19 \times 10^{-2} (\text{Cd}, \mu\text{g/L}) + 7 \times 10^{-4}; r = 0,9999$$

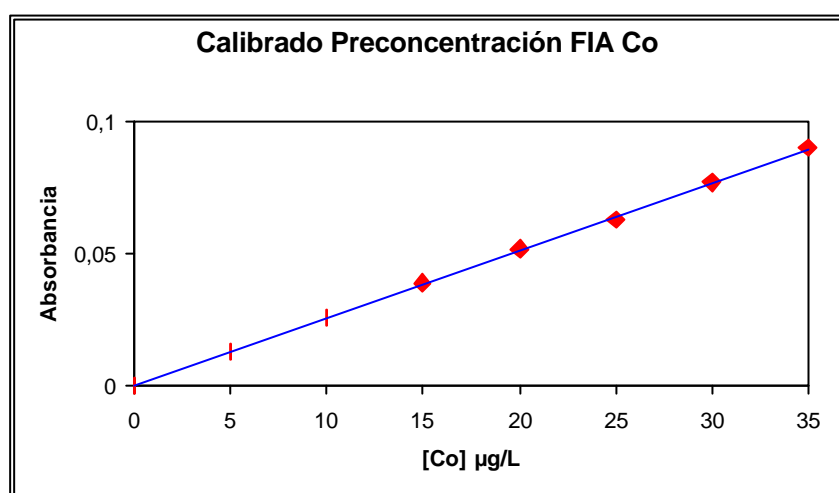


Figura 87 (II).- Calibrado FIA para la preconcentración de cobalto

$$A = 2,5 \times 10^{-3} (\text{Co}, \mu\text{g/L}) + 3 \times 10^{-4}; r = 0,9999$$

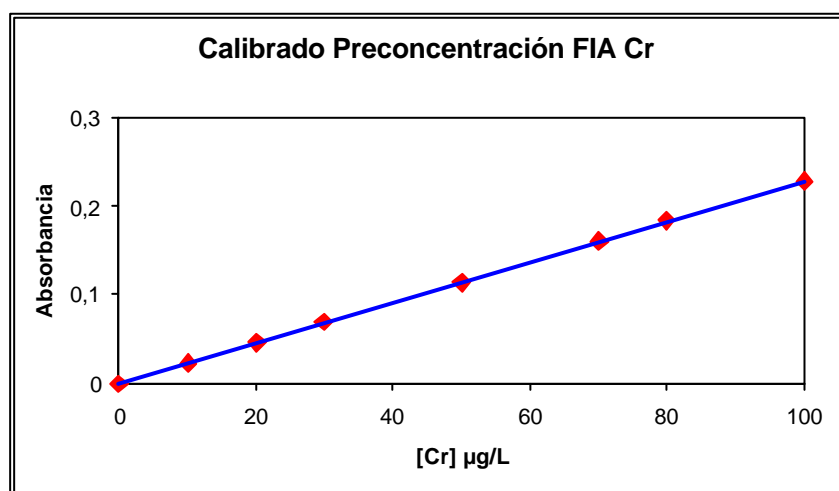


Figura 87 (III).- Calibrado FIA para la preconcentración de cromo

$$A = 2,3 \times 10^{-3} (\text{Cr}, \mu\text{g/L}) + 5 \times 10^{-5}; r = 0,9999$$

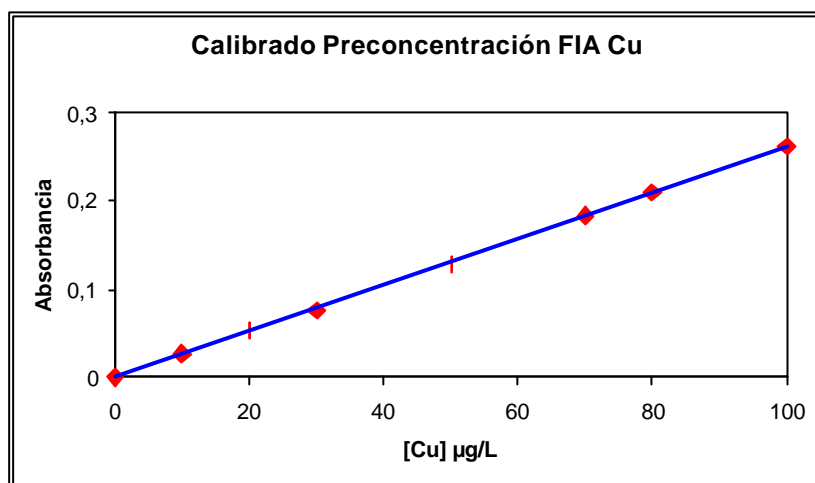


Figura 87 (IV).- Calibrado FIA para la preconcentración de cobre

$$A = 2,6 \times 10^{-3} (\text{Cu}, \mu\text{g/L}) + 3 \times 10^{-4}; r = 0,9998$$

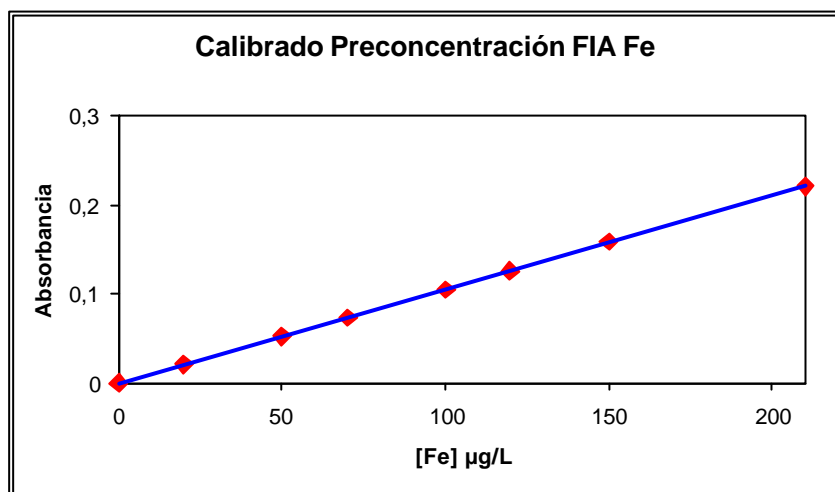


Figura 87 (V).- Calibrado FIA para la preconcentración de hierro

$$A = 1,1 \times 10^{-3} (\text{Fe}, \mu\text{g/L}) + 2 \times 10^{-4}; r = 0,9999$$

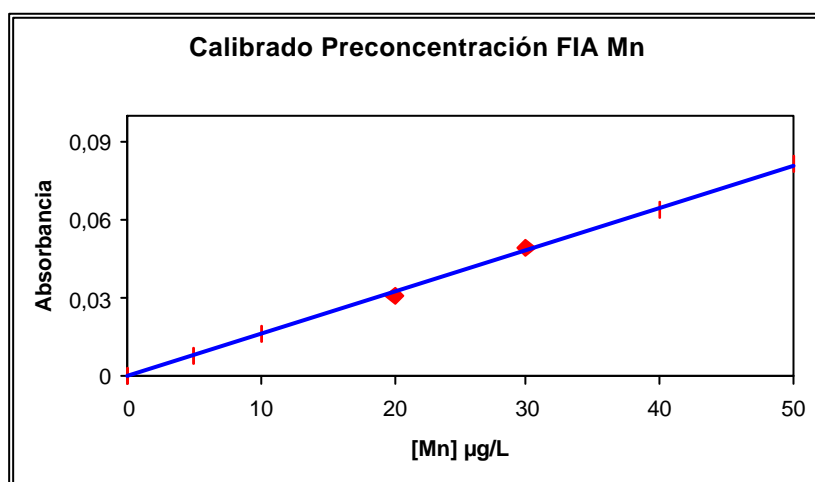


Figura 87 (VI).- Calibrado FIA para la preconcentración de manganeso

$$A = 1,6 \times 10^{-3} (\text{Mn}, \mu\text{g/L}) + 3 \times 10^{-4}; r = 0,9998$$

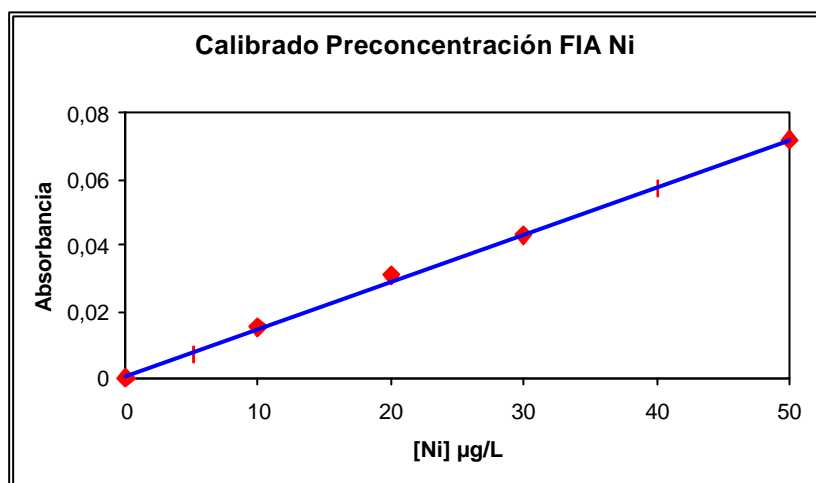


Figura 87 (VII).- Calibrado FIA para la preconcentración de níquel

$$A = 1,5 \times 10^{-3} (\text{Ni}, \mu\text{g/L}) + 5 \times 10^{-4}; r = 0,9993$$

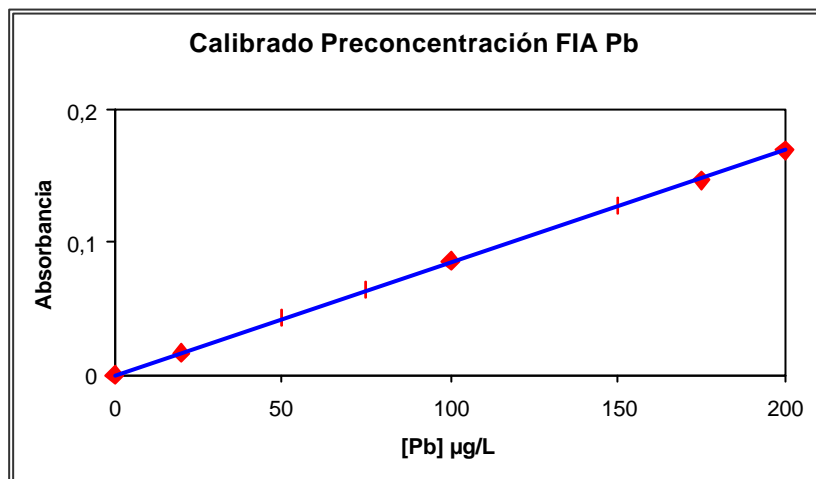


Figura 87 (VIII).- Calibrado FIA para la preconcentración de plomo

$$A = 8,5 \times 10^{-4} (\text{Pb}, \mu\text{g/L}) + 6 \times 10^{-4}; r = 0,9998$$

El factor de preconcentración se calcula como el cociente entre la pendiente de la recta de calibrado con preconcentración y la pendiente de la recta de calibrado directa (sin preconcentración). Las ecuaciones de las rectas de calibrado directas se muestran en las páginas 160-162. Por tanto, los factores de preconcentración así calculados aparecen en la Tabla CIV.

Tabla CIV.- Factores de preconcentración obtenidos para los metales utilizando el sistema FIA propuesto

	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb
Factor de preconcentración	78,8	80,6	42,6	42,6	21,7	21,3	44,1	43,6

### 5.2.- Límites de Detección y Límites de Cuantificación

El cálculo del LOD y LOQ se realizó en base a la determinación de 30 medidas de un blanco (disolución 4 M HNO<sub>3</sub>), realizadas en las condiciones óptimas. Se calculó el valor de  $3\sigma$  para el LOD y  $10\sigma$  para el LOQ y se sustituyó cada valor en la recta de calibrado del método para cada metal. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla CV.

Tabla CV.- LOD y LOQ para la determinación de metales en muestras de orina

	Volumen de muestra (mL)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Cd	9,0	0,1	0,3
Co	9,0	0,5	1,6
Cr	5,0	0,5	1,8
Cu	5,0	0,5	1,5
Fe	2,5	1,1	3,7
Mn	2,5	0,8	2,5
Ni	5,0	0,8	2,6
Pb	5,0	1,4	4,6

### 5.3.- Sensibilidad del Método Analítico

La sensibilidad según la IUPAC y la sensibilidad para un 1% de absorción, se presentan en la Tabla CVI.

Tabla CVI.- Sensibilidad en la determinación de metales en muestras de orina

	Volumen de muestra (mL)	Sensibilidad (µg/L) x 10 <sup>3</sup>	Sensibilidad 1 % absorción (µg/L)
Cd	9,0	11,9	0,3
Co	9,0	2,5	1,6
Cr	5,0	2,3	1,9
Cu	5,0	2,6	1,6
Fe	2,5	1,1	3,8
Mn	2,5	1,6	2,6
Ni	5,0	1,5	2,6
Pb	5,0	0,85	4,5

#### 5.4.-Intervalo Lineal

Según las ecuaciones de las rectas, los límites de cuantificación obtenidos, el factor de preconcentración del sistema FIA alcanzado en cada caso y conociendo que en espectroscopía de absorción atómica con llama los límites de linealidad para la determinación directa de los metales son los que se muestran en la Tabla XXVI (página 154), los intervalos lineales correspondientes a la determinación de cada metal se reflejan en la Tabla CVII.

Tabla CVII.- Intervalos lineales en la determinación de metales en muestras de orina

	Volumen de muestra (mL)	Intervalo Lineal ( $\mu\text{g/L}$ )
Cd	9,0	0,3-25,4
Co	9,0	1,5-43,4
Cr	5,0	1,8-117,4
Cu	5,0	1,5-117,4
Fe	2,5	3,7-230,4
Mn	2,5	2,5-93,9
Ni	5,0	2,6-45,4
Pb	5,0	4,6-458,7

#### 5.5.-Estudio de la Precisión del Método

Para evaluar la precisión del método analítico se hizo un estudio de la repetibilidad del proceso global para la determinación de los metales en muestras de orina. Para ello se midieron veintidós muestras reales (once de una muestra de orina perteneciente a un trabajador expuesto a humos de soldadura y once de una muestra de orina de una persona control (no expuesta a humos de soldadura)). Estas muestras se analizaron con el sistema FIA propuesto, y en las condiciones óptimas. Para el Cd, Co se tomaron 9 mL de muestra, para Cr, Cu, Ni y Pb 5 mL y para Fe y Mn 2,5 mL de muestra. Con los resultados obtenidos se calculó la desviación estándar, la media y el coeficiente de variación. Estos valores se muestran en la Tabla CVIII. En esta

Tabla se puede observar que la precisión obtenida es aceptable para la determinación de metales en la orina de trabajadores expuestos a humos de soldadura, ya que la muestra de orina presenta una mayor concentración metálica que la que se obtiene para la muestra control.

En el caso de la concentración cadmio y cromo, las concentraciones encontradas en la muestra control se sitúan a niveles próximos a los límites de cuantificación del método, por eso los coeficientes de variación son los más altos (12,5 y 11,8%, respectivamente). Por lo demás, los restantes coeficientes de variación se encuentran por debajo del 5% para la orina de un trabajador expuesto a humos de soldadura (concentración metálica mayor). De esta manera, se puede confirmar la precisión de la metodología analítica propuesta para la determinación de metales en orina de trabajadores expuestos a humos de soldadura, y la obtención de resultados óptimos para la determinación de cobalto, cobre, hierro, manganeso, níquel y plomo en las muestras control.

Tabla CVIII.- Estudio de la precisión en la determinación de metales en muestras de orina

	Trabajador expuesto a humos de soldadura (media $\pm$ <b>s</b> ) ( $\mu\text{g/L}$ )	CV (%)	Persona control (media $\pm$ <b>s</b> ) ( $\mu\text{g/L}$ )	CV (%)
Cd	1,0 $\pm$ 0,07	7,0	0,4 $\pm$ 0,05	12,5
Co	3,9 $\pm$ 0,2	5,0	2,7 $\pm$ 0,2	7,4
Cr	14,2 $\pm$ 0,2	1,4	1,7 $\pm$ 0,2	11,8
Cu	39,5 $\pm$ 0,2	0,5	28,4 $\pm$ 0,2	0,7
Fe	179,2 $\pm$ 0,8	0,5	129,0 $\pm$ 0,8	0,6
Mn	19,2 $\pm$ 0,3	1,6	5,4 $\pm$ 0,3	3,7
Ni	15,7 $\pm$ 0,4	2,5	5,6 $\pm$ 0,3	5,4
Pb	49,0 $\pm$ 0,6	1,2	9,0 $\pm$ 0,6	6,6

### 5.6.- Estudio de la Exactitud del Método

La comprobación de la exactitud de la metodología analítica propuesta se realizó de dos maneras: realizando el test de parejas (comparación con un método de referencia) y estudio de la recuperación analítica.

#### 5.6.1. Comparación con el método de referencia

Este estudio se aplicó a una muestra de orina (de un trabajador expuesto a humos de soldadura). Los metales en esta muestra se determinaron por un método de referencia (basado en una digestión ácida convencional con ácido nítrico concentrado [227] y medida continua de los metales por FAAS mediante el dispositivo FIA optimizado) y por el método propuesto. Con el fin de establecer la exactitud del método propuesto se aplicó el test de parejas calculándose la media y la desviación estándar de las diferencias entre los resultados obtenidos por ambos métodos para cada uno de los metales (Tabla CIX).

Tabla CIX.- Determinación de metales en muestras de orina: test de parejas

	Concentración, µg/L		Diferencia
	Método Propuesto	Método de Referencia	
Cd	1,0	1,0	0
Co	3,9	3,6	0,3
Cr	14,2	14,4	-0,2
Cu	39,5	39,7	-0,2
Fe	179,2	180,0	-0,8
Mn	19,2	19,1	0,1
Ni	15,7	15,9	-0,2
Pb	49,0	49,9	-0,9

$$\bar{X}_d = -0,24$$

$$\sigma_d = 0,42$$



*Test de parejas:*

a)

Hipótesis nula:	$H_0 : \bar{X}_d = 0$
Hipótesis alternativa:	$H_1 : \bar{X}_d \neq 0$

b) Cálculo del valor de t experimental:  $t_{\text{exp}} = \frac{\bar{X}_d \sqrt{n}}{\sigma_d} = 1,6$

c) t tabulado para n-1 grados de libertad y 95% de probabilidad (test de dos colas):  $t_{\text{tabulado}} = 2,36$

d) Como  $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabulado}}$  se acepta  $H_0$ , al nivel de significación elegido (95%). Por tanto, los valores obtenidos sobre diferentes muestras son comparables estadísticamente al nivel de significación elegido, es decir, no hay diferencias entre los resultados obtenidos por los dos métodos. Como un grupo de resultados se halló con el método de referencia, se puede decir que el otro (método propuesto) es estadísticamente comparable, y por tanto, exacto.

#### 5.6.2.- Recuperación del método

El método de determinación de los metales en muestras de orina se aplicó a una muestra de orina de un trabajador expuesto a humos de soldadura a la que se le había adicionado 10 µg/L de cada metal.

Una vez obtenidos los datos de estos análisis se calculó el % de Recuperación de la siguiente forma:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

Siendo:

A: [Metal] en la muestra + [Metal] añadida  
(valor calculado experimentalmente)

B: [Metal] en la muestra (valor calculado experimentalmente)

C: [Metal] añadida

Los resultados obtenidos para la recuperación analítica se reflejan en la Tabla CX.

Tabla CX.- Resultados del cálculo de la recuperación analítica

	% Recuperación Analítica
Cd	99,2
Co	100,0
Cr	96,0
Cu	104,0
Fe	97,5
Mn	96,8
Ni	99,1
Pb	98,7

A la vista de los resultados obtenidos, se observa que la recuperación de los metales, en todos los casos es cuantitativa, ya que el tanto por ciento de recuperación oscila entre 96,0 - 104,0%.

## 5.7.- Recta de Adición

Para comprobar si existe efecto matriz se utilizó la técnica de las adiciones estándar. Para ello se analizó una muestra de orina de un trabajador expuesto a humos de soldadura. El método se aplicó a una muestra a la que se le habían adicionado distintas concentraciones de cada metal. El intervalo de concentraciones adicionado para cada metal se muestra en la Tabla CXI.

Tabla CXI.- Características de las rectas de adición de los distintos metales

	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb
Intervalo de concentración adicionado (µg/L)	0-15	0-20	0-30	0-30	0-30	0-30	0-15	0-50

Con los resultados de absorbancia obtenidos se trazaron las rectas de adición para cada metal (Figuras 88 (I-VIII)).

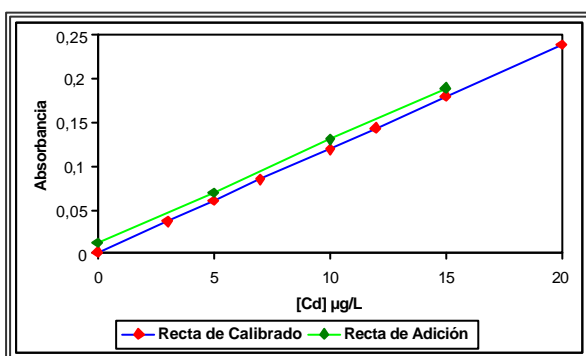


Figura 88 (I).- Cd: Recta de Adición  
 $A = 1,19 \times 10^{-2} (\text{Cd}, \mu\text{g/L}) + 0,0115$ ;  
 $r = 0,999$

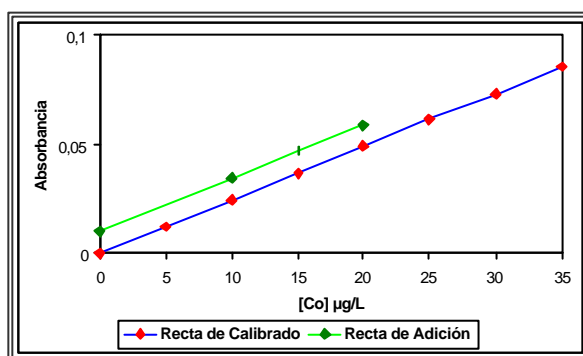


Figura 88 (II).- Co: Recta de Adición  
 $A = 2,5 \times 10^{-3} (\text{Co}, \mu\text{g/L}) + 0,0102$ ;  
 $r = 0,999$

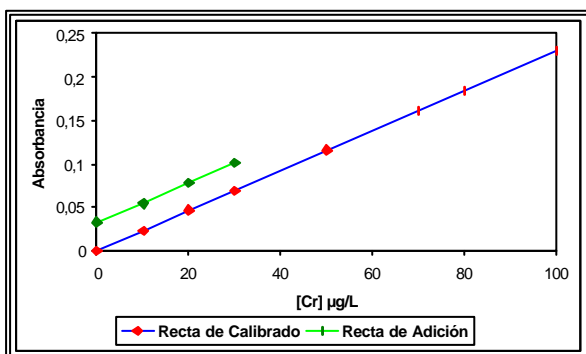


Figura 88 (III).-Cr: Recta de Adición  
 $A = 2,3 \times 10^{-3} (\text{Cr}, \mu\text{g/L}) + 0,0327$ ;  
 $r = 0,999$

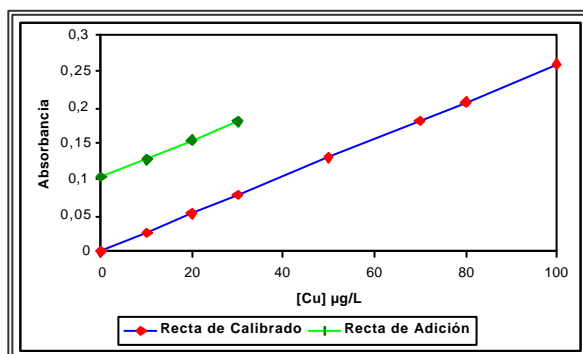


Figura 88 (IV).- Cu: Recta de Adición  
 $A = 2,6 \times 10^{-3} (\text{Cu}, \mu\text{g/L}) + 0,1028$ ;  
 $r = 0,999$

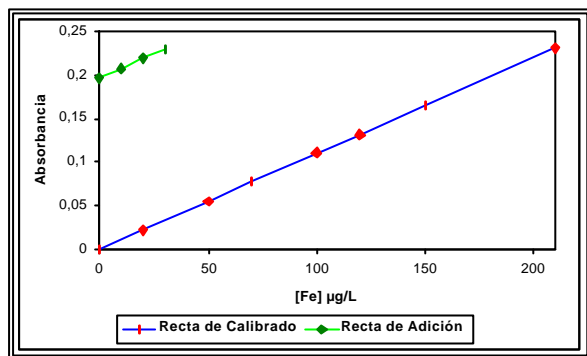


Figura 88 (V).- Fe: Recta de Adición

$$A = 1,1 \times 10^{-3} (\text{Fe } \mu\text{g/L}) + 0,197;$$

$$r = 0,999$$

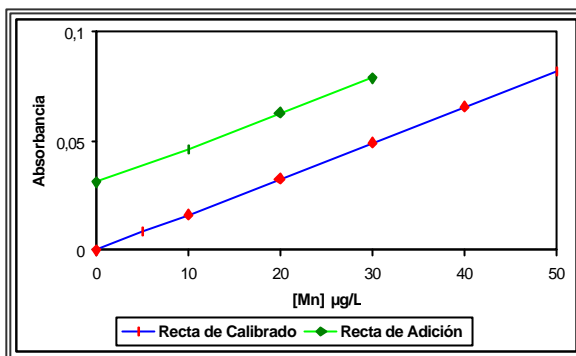


Figura 88 (VI).- Mn: Recta de Adición

$$A = 1,6 \times 10^{-3} (\text{Mn } \mu\text{g/L}) + 0,0306;$$

$$r = 0,999$$

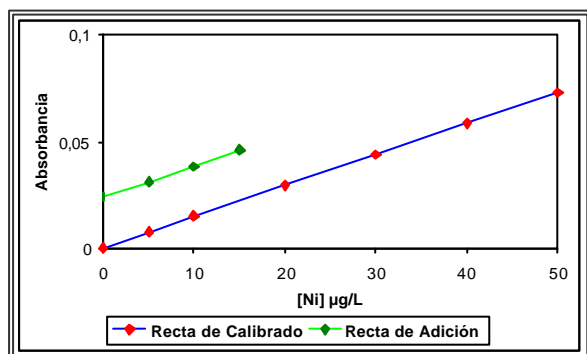


Figura 88 (VII).- Ni: Recta de Adición

$$A = 1,5 \times 10^{-3} (\text{Ni } \mu\text{g/L}) + 0,0238;$$

$$r = 0,999$$

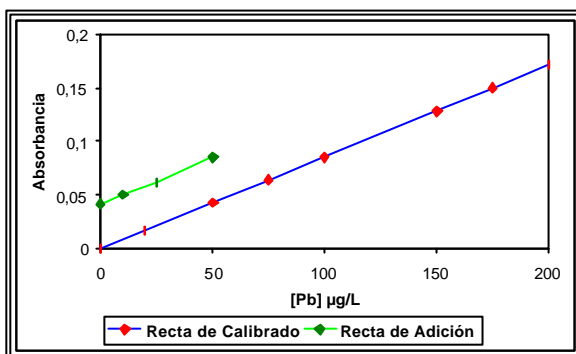


Figura 88 (VIII).- Pb: Recta de Adición

$$A = 9,0 \times 10^{-4} (\text{Pb } \mu\text{g/L}) + 0,0441;$$

$$r = 0,999$$

En las Figuras 88 (I-VIII), se observa que ambas rectas (calibrado y adición) son totalmente paralelas. Este paralelismo entre ambas rectas se comprueba estadísticamente (test t, nivel de confianza 95%) mediante el programa ULC (Univariate Linear Calibration) [208]. Por tanto, no tiene lugar ningún efecto matriz. Así, se puede calcular la concentración de los metales directamente en las muestras utilizando la recta de calibrado.

## 5.8.- Frecuencia de Muestreo

Se calculó la frecuencia de muestreo del método propuesto. Para ello se consideró la duración de la etapa de digestión (3 min) y la duración de las etapas de preconcentración y elución-detección. De esta manera, las frecuencias de muestreo para la determinación de los distintos metales en muestras de orina se reflejan en la Tabla CXII.

Tabla CXII.- Frecuencia de muestreo para la determinación de metales en muestras de orina

	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb
Frecuencia de muestreo (muestras/h)	6	6	9	9	12	12	9	9

## 6.- APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE ORINA

La metodología propuesta se aplicó a muestras reales. Las muestras de orina analizadas se recogieron de trabajadores expuestos a humos de soldadura y de personas control (de personas no expuestas a humos de soldadura). Estas muestras se tomaron según lo indicado previamente en la página 307, y se conservaron en nevera. Al llegar al laboratorio se les añadió ácido nítrico de manera que resulte una concentración final de ácido 4 M.

Las muestras se analizaron por triplicado con el sistema FIA propuesto, y en las condiciones óptimas.

Los resultados obtenidos para la orina de trabajadores expuestos a humos de soldadura se muestran en la Tabla CXIII y los obtenidos para la orina control en la Tabla CXIV.

Tabla CXIII.- Concentración de metales en muestras de orina de trabajadores expuestos a humos de soldadura

		Concentración de los metales en orina (media $\pm$ s) ( $\mu\text{g/L}$ )							
Nº de muestra	Puesto de Trabajo	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb
1	Soldador	1,0 $\pm$ 0,07	N.D.	14,2 $\pm$ 0,2	39,5 $\pm$ 0,2	179,2 $\pm$ 0,8	19,2 $\pm$ 0,3	15,7 $\pm$ 0,4	20,7 $\pm$ 0,6
2	Soldador	2,3 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,2	25,1 $\pm$ 0,2	28,0 $\pm$ 0,2	126,7 $\pm$ 0,5	15,8 $\pm$ 0,3	10,5 $\pm$ 0,4	41,8 $\pm$ 0,6
3	Soldador	3,4 $\pm$ 0,1	5,5 $\pm$ 0,2	44,4 $\pm$ 0,7	21,1 $\pm$ 0,2	89,7 $\pm$ 0,5	12,1 $\pm$ 0,3	16,9 $\pm$ 0,3	49,0 $\pm$ 0,6
4	Soldador	2,0 $\pm$ 0,1	6,3 $\pm$ 0,2	38,4 $\pm$ 0,5	44,9 $\pm$ 0,2	181,8 $\pm$ 1,0	20,4 $\pm$ 0,3	20,2 $\pm$ 0,4	29,3 $\pm$ 0,6
5	Mecánico	N.D.	N.D.	7,1 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 0,2	100,6 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 0,3	8,5 $\pm$ 0,3	52,9 $\pm$ 0,6
6	Electricista	2,6 $\pm$ 0,1	N.D.	12,1 $\pm$ 0,2	14,7 $\pm$ 0,2	127,0 $\pm$ 0,5	12,7 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 0,4	9,6 $\pm$ 0,6
7	Personal técnico	N.D.	N.D.	5,1 $\pm$ 0,2	20,1 $\pm$ 0,2	129,0 $\pm$ 0,8	5,4 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,3	5,8 $\pm$ 0,6

<sup>1</sup> N.D.: No detectado

Tabla CXIV.- Concentración de metales en muestras de orina control

	Concentración de los metales en orina (media $\pm$ s) ( $\mu\text{g/L}$ )							
Nº de muestra	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb
1	N.D.	N.D.	N.D.	$28,4 \pm 0,2$	$129,0 \pm 0,8$	$5,4 \pm 0,3$	$5,6 \pm 0,3$	$9,0 \pm 0,6$
2	N.D.	$2,7 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,2$	$140,6 \pm 0,5$	$9,2 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,6$
3	$0,4 \pm 0,05$	N.D.	$2,7 \pm 0,2$	$10,7 \pm 0,2$	$151,2 \pm 0,5$	$4,8 \pm 0,3$	N.D.	N.D.
4	N.D.	N.D.	$3,8 \pm 0,2$	$14,9 \pm 0,2$	$59,4 \pm 0,5$	N.D.	N.D.	N.D.
5	N.D.	N.D.	N.D.	$5,7 \pm 0,2$	$70,6 \pm 0,5$	N.D.	N.D.	N.D.
6	$0,4 \pm 0,05$	$3,5 \pm 0,2$	N.D.	$7,8 \pm 0,2$	$127,0 \pm 0,5$	N.D.	N.D.	N.D.
7	N.D.	N.D.	N.D.	$20,1 \pm 0,2$	$109,7 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,3$	$7,4 \pm 0,6$

<sup>1</sup> N.D.: No detectado



Como se puede observar en las Tablas CXIII y CXIV, y en las Figuras 89 (I-VIII), la concentración metálica en las muestras de orina analizadas es mayor para aquellas muestras pertenecientes a trabajadores expuestos a humos de soldadura, aunque esto ocurre menos marcadamente en el caso del hierro. Los valores más altos se encuentran en la orina de los trabajadores directamente expuestos (soldadores). Sin embargo, sólo en el caso del níquel y plomo, alguna muestra supera el valor considerado como normal para la orina de personas no directamente expuestas a humos metálicos (Tabla VI, p.52). En el caso del Cr, para la orina de trabajadores expuestos, la concentración encontrada supera en algunos casos el VLB (página 51) [27].

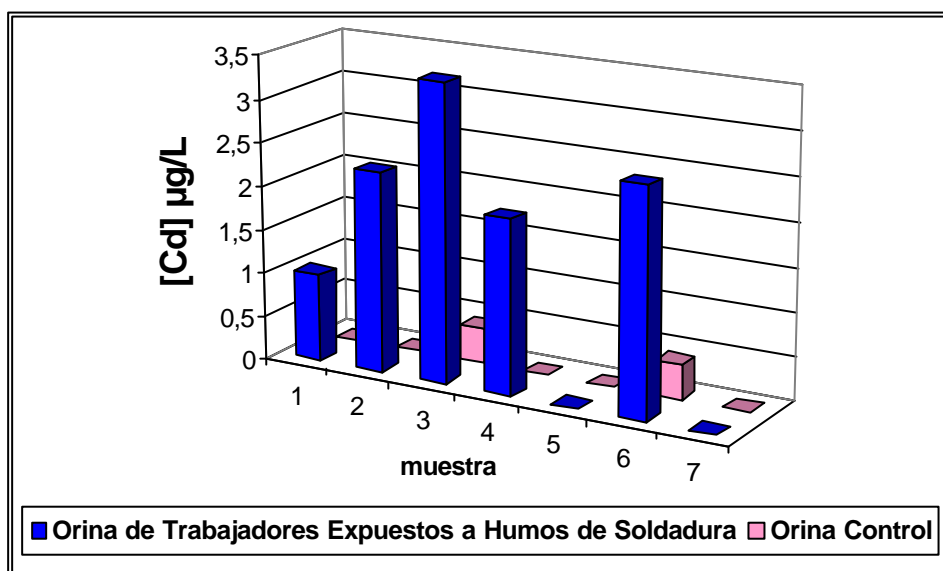


Figura 89 (I).- Resultados Cd orina

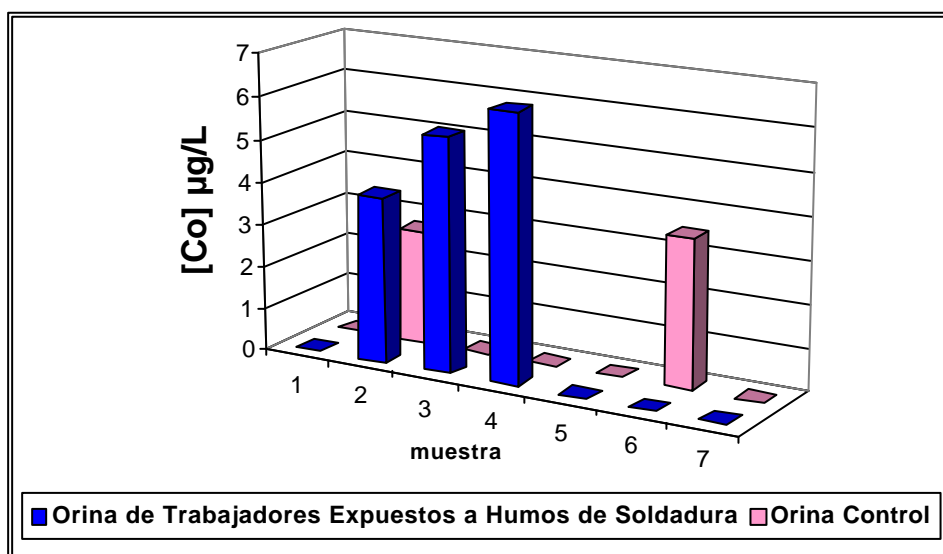


Figura 89 (II).- Resultados Co en orina

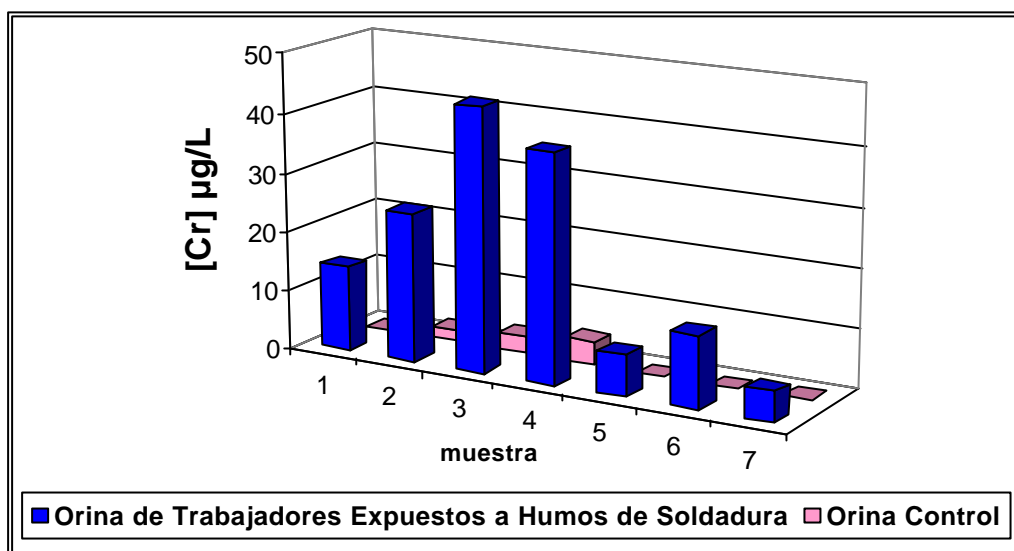


Figura 89 (III).- Resultados Cr en orina

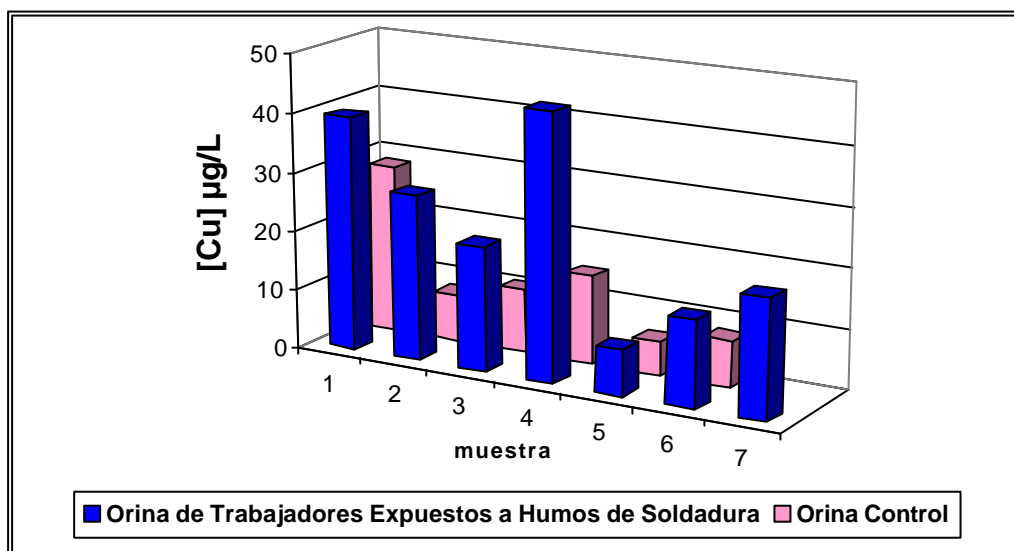


Figura 89 (IV).- Resultados Cu en orina

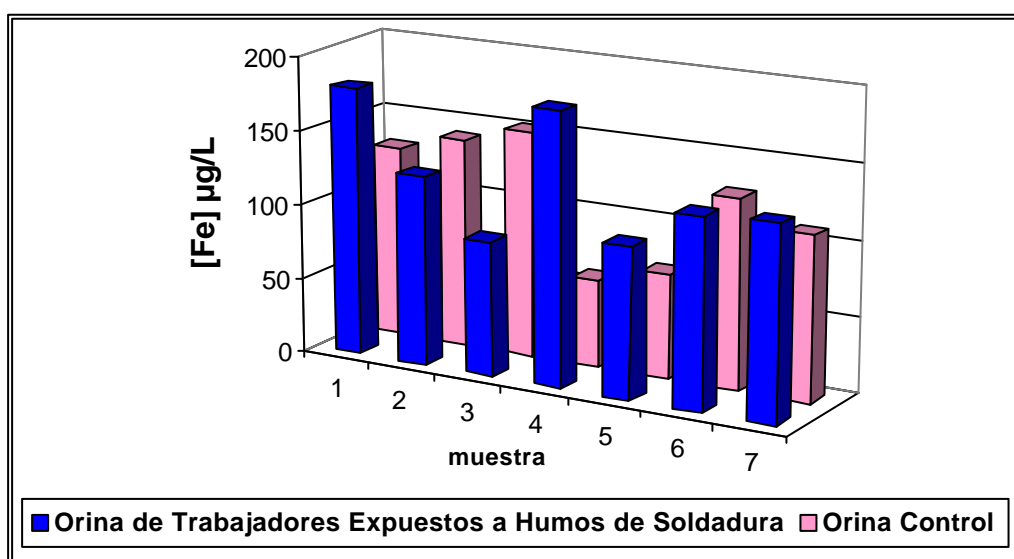


Figura 89 (V).- Resultados Fe en orina

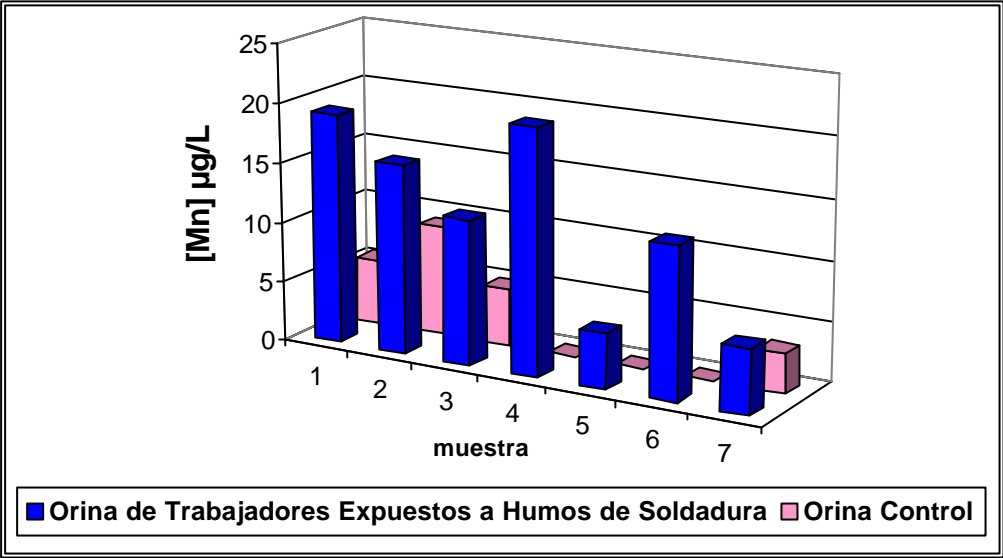


Figura 89 (VI).- Resultados Mn en orina

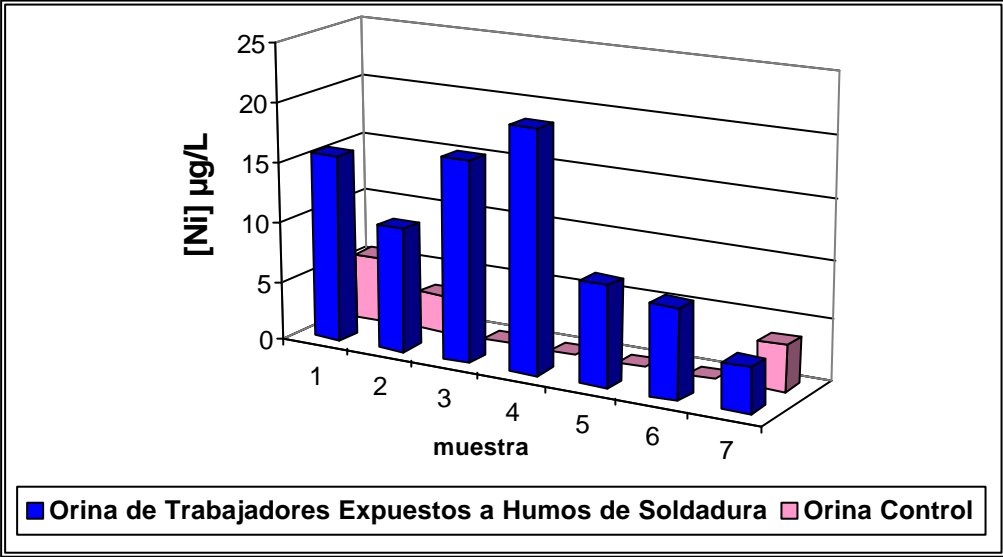


Figura 89 (VII).- Resultados Ni en orina

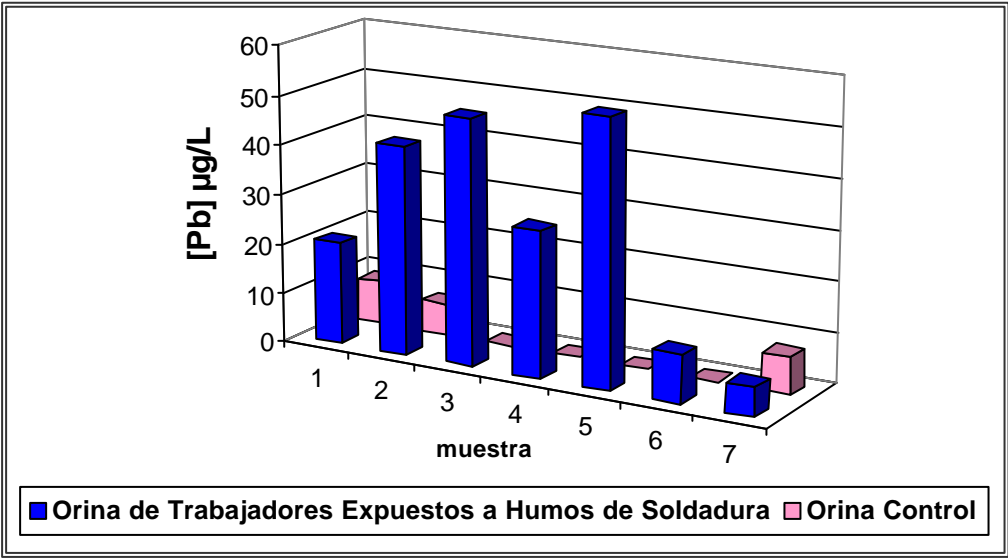


Figura 89 (VIII).- Resultados Pb en orina

## 7.- DETERMINACIÓN DE CINCO EN ORINA

Como ya se indicó en la página 308, se realizó un estudio preliminar para determinar si algún metal se podría determinar directamente sin incorporar a la metodología analítica una técnica de separación. Así, se concluyó que tanto por la sensibilidad que presenta el cinc al ser determinado por espectroscopia de absorción atómica con llama (FAAS), como por las concentraciones de este metal existentes en las muestras de orina (en el caso de orina procedente de trabajadores expuestos a contaminación metálica y en orina control) sería posible la determinación directa de este metal. Sin embargo, cuando se realiza la medida directa sin eliminar la matriz de la muestra, se podrían producir interferencias debidas a la matriz de la muestra (componentes orgánicos y elevada matriz salina). Estos inconvenientes se pueden reducir y/o eliminar si la concentración salina se reduce al realizar la dilución de la muestra [228-230].

Por tanto, para realizar la determinación continua de cinc en muestras de orina se ha utilizado un sistema FIA que permite la dilución en línea de dichas muestras (Figura 90).

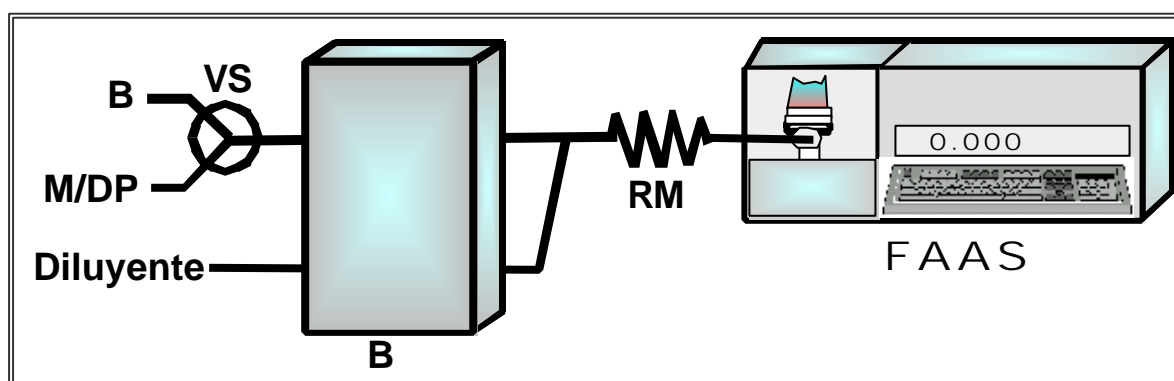


Figura 90.- Sistema FIA usado para la determinación de cinc en orina. VS, válvula de selección; B, blanco; M/DP, muestra/disolución patrón; RM, reactor de mezcla; B, bomba peristáltica; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama

### 7.1. Optimización de las variables implicadas en el sistema FIA

Para realizar la optimización de las variables implicadas en el sistema FIA de dilución en línea de la muestra de orina se analizó una muestra de orina (de un trabajador expuesto a humos de soldadura). En esta muestra se determinó previamente la concentración de cinc por un método de referencia (basado en una digestión ácida convencional de 10 mL de muestra con 10 mL de ácido nítrico concentrado, evaporación casi hasta sequedad, posterior dilución de la muestra con agua ultrapura y medida discontinua de cinc por FAAS [227]). La concentración de cinc así determinada por triplicado resultó ser de  $569,8 \pm 26,3 \mu\text{g/L}$ .

Como la concentración normal de cinc en orina es 270-850  $\mu\text{g/L}$  [75], y como la determinación de cinc por FAAS es lineal hasta 1  $\mu\text{g/mL}$ , se pensó que una dilución 1:10 sería adecuada para realizar la determinación de cinc en muestras de orina. Este factor de dilución en línea se consigue modificando el canal de muestra y el canal de dilución. Además, hay que tener en cuenta que como con un caudal de aspiración del nebulizador de 4 mL/min se consigue la mayor sensibilidad, el caudal resultante de la mezcla del canal de la muestra y del canal la disolución diluyente debería tener este valor. De esta manera, se consigue una dilución 1:10 utilizando un caudal de muestra de 0,4 mL/min y un caudal de diluyente de 3,6 mL/min.

Teniendo en cuenta todo esto, la optimización del sistema FIA de la Figura 90 se realizó considerando lo siguiente:

- Caudal de muestra: 0,4 mL/min
- Caudal de diluyente: 3,6 mL/min
- Diluyente utilizado: ácido nítrico 3 M
- Longitud del reactor de mezcla: 25 cm

Con estas condiciones se calculó por triplicado la variable respuesta (% Recuperación):

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{A}{B} \times 100$$

Siendo:

A: concentración de Zn obtenida por el método propuesto

B: concentración de Zn obtenida por el método de referencia

El % de Recuperación obtenido resultó ser de 99,9%.

Por último, se estudió si como disolución diluyente se podía emplear agua ultrapura. Así, se comprobó que realizando la dilución con agua también se eliminaban las interferencias debidas a la matriz de la muestra, ya que en estas condiciones se obtuvo una recuperación cuantitativa (102,4%).

## 7.2.- Método propuesto para la determinación de cinc en orina

### 7.2.1.- Aparatos, instrumentación analítica y reactivos

#### *Aparatos e Instrumentación Analítica*

Ver página 106. Las condiciones de medida para el cinc en el espectrofotómetro de absorción atómica con llama se muestran en la Tabla XXVI (página 154).

#### *Reactivos*

Ver página 107.

### 7.2.2.- Procedimiento para la determinación de cinc en orina

El esquema de trabajo del método optimizado para la determinación de cinc en orina se basa en el esquema que se muestra en la Figura 91:

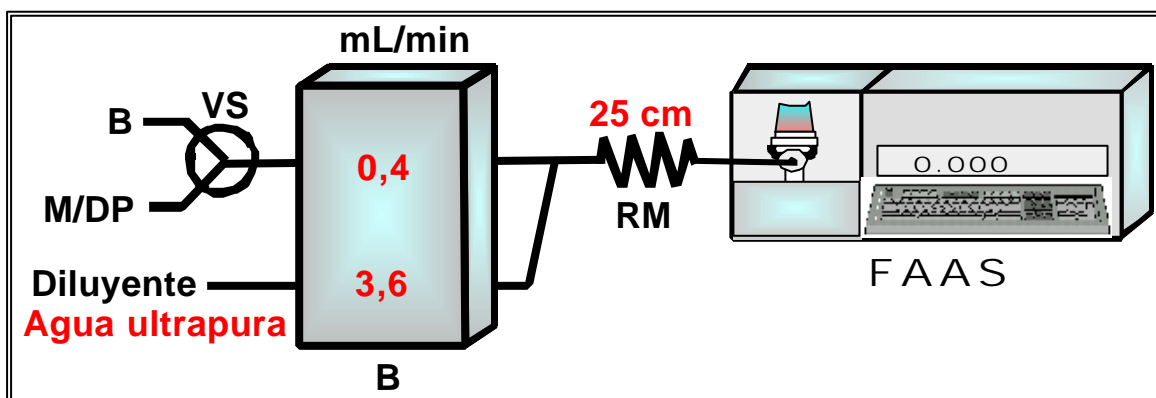


Figura 91.- Sistema FIA optimizado usado para la determinación de cinc en orina. VS, válvula de selección; B, blanco; M/DP, muestra/disolución patrón; RM, reactor de mezcla; B, bomba peristáltica; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama

La muestra de orina se introduce de manera continua en el sistema FIA a 0,4 mL/min. El canal de muestra converge con el canal de dilución (agua ultrapura), el cual se introduce en el sistema FIA a 3,6 mL/min. Una vez mezclados ambos canales y homogenizada la disolución resultante en el reactor de mezcla (RM), la muestra diluida llega de manera continua al detector (espectrofotómetro de absorción atómica con llama).

Para realizar la recta de calibrado se introducen secuencialmente en el sistema FIA disoluciones patrón (DP) de distintas concentraciones de cinc preparadas en agua ultrapura. El blanco es agua ultrapura.

### 7.3. Características analíticas del método propuesto para la determinación de cinc en muestras de orina

Se evaluaron las características analíticas del método desarrollado para la determinación de cinc en muestras de orina, calculando el límite de detección y cuantificación, la sensibilidad, el intervalo lineal, la precisión y la exactitud. Además, se estudió el efecto matriz comparando las rectas de calibrado y adición, y se determinó la frecuencia de muestreo.

#### 7.3.1. Recta de Calibrado

Se realizó el calibrado usando el sistema FIA propuesto con disoluciones patrón de cinc entre 0-1500 µg/L (Figura 92).

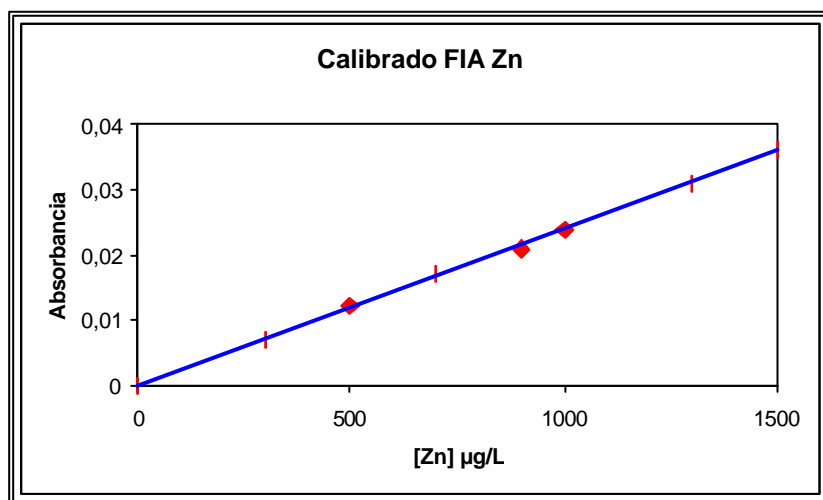


Figura 92.- Calibrado FIA para la determinación de cinc

$$A = 2,4 \times 10^{-5} (\text{Zn}, \mu\text{g/L}) + 9 \times 10^{-4}; r = 0,9999$$

El factor de dilución se calculó como el cociente entre la pendiente de la recta de calibrado directa (sin dilución) y la pendiente de la recta de calibrado FIA con dilución. La ecuación de la recta de calibrado directa obtenida para el Zn se muestra en la página 162. Por tanto, el factor de dilución así calculado fue de 10.

#### 7.3.2.- Límite de Detección y Límite de Cuantificación

El cálculo del LOD y LOQ se realizó en base a la determinación de 30 medidas de un blanco (agua ultrapura) realizadas en las condiciones óptimas. Se calculó el valor de  $3\sigma$  para el LOD y  $10\sigma$  para el LOQ y se sustituyó cada valor en la recta de calibrado del método. Los valores obtenidos fueron 38,8 y 129,2  $\mu\text{g/L}$  Zn, respectivamente para el LOD y el LOQ.

#### 7.3.3.- Sensibilidad del Método Analítico

La sensibilidad según la IUPAC y la sensibilidad para un 1% de absorción, son respectivamente  $2,4 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g/L}$  Zn y 145,8  $\mu\text{g/L}$  Zn.

#### 7.3.4.-Intervalo Lineal

Según la ecuación de la recta, el límite de cuantificación obtenido, el factor de dilución alcanzado en el sistema FIA y conociendo que en espectroscopía de absorción atómica con llama el límite de linealidad para la determinación directa de Zn es 1  $\mu\text{g/mL}$ , el intervalo lineal correspondiente a la determinación de cinc es de 129,2-10000  $\mu\text{g/L}$ .

#### 7.3.5.-Estudio de la Precisión del Método

Para evaluar la precisión del método analítico se hizo un estudio de la repetibilidad del proceso utilizado para la determinación de cinc en muestras de orina. Para ello se midieron veintidós muestras reales (once de una muestra de orina perteneciente a un trabajador expuesto a humos de soldadura y once de una muestra de orina de una persona control (no expuesta a humos de soldadura). Estas muestras se analizaron con el sistema FIA propuesto, y en las condiciones óptimas. Con los resultados obtenidos se calculó la desviación estándar, la media y el coeficiente de variación. Estos valores se muestran en la Tabla CXV. En esta Tabla se puede observar que se



obtiene una buena precisión en los resultados de la determinación de cinc en la orina ( $CV < 5\%$ ).

Tabla CXV.- Estudio de la precisión en la determinación de cinc en muestras de orina

Trabajador expuesto a humos de soldadura		Persona control	
[Zn] (media $\pm s$ ) ( $\mu\text{g/L}$ )	CV (%)	[Zn] (media $\pm s$ ) ( $\mu\text{g/L}$ )	CV (%)
825,7 $\pm$ 16,8	2,0	382,6 $\pm$ 16,9	4,4

#### 7.3.6.- Estudio de la Exactitud del Método

La comprobación de la exactitud de la metodología analítica propuesta se realizó de dos maneras: realizando el test de parejas (comparación con un método de referencia) y estudio de la recuperación analítica.

##### 7.3.6.1. Comparación con el método de referencia

Este estudio se aplicó a distintas muestras de orina donde se determinó la concentración de cinc por un método de referencia [227] y por el método propuesto. Con los resultados obtenidos por ambos métodos se aplicó el test de parejas calculándose la media y la desviación estándar de las diferencias entre los resultados obtenidos por los dos métodos utilizados (Tabla CXVI).

Tabla CXVI.- Determinación de cinc en muestras de orina: test de parejas

Muestra	[Zn] $\mu\text{g/L}$		Diferencia
	Método Propuesto	Método de Referencia	
Orina 1	569,4	569,8	-0,4
Orina 2	825,7	825,0	-0,7
Orina 3	382,6	379,2	3,4
Orina 4	845,0	835,6	9,4
Orina 5	416,7	420,8	-4,1

$$\bar{X}_d = 1,52; \sigma_d = 5,14$$

*Test de parejas:*

a)

Hipótesis nula:	$H_0 : \bar{X}_d = 0$
Hipótesis alternativa:	$H_1 : \bar{X}_d \neq 0$

b) Cálculo del valor de t experimental:  $t_{\text{exp}} = \frac{\bar{X}_d \sqrt{n}}{\sigma_d} = 0,66$

c)  $t_{\text{tabulado}}$  para  $n-1$  grados de libertad y 95% de probabilidad (test de dos colas):  $t_{\text{tabulado}} = 2,77$

d) Como  $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabulado}}$  se acepta  $H_0$ , al nivel de significación elegido (95%). Por tanto, los valores obtenidos sobre diferentes muestras son comparables estadísticamente al nivel de significación elegido, es decir, no hay diferencias entre los resultados obtenidos por los dos métodos. Como un grupo de resultados se halló con el método de referencia, se puede decir que el otro (método propuesto) es estadísticamente comparable, y por tanto, exacto.

#### 7.3.6.2.- Recuperación del método

El método de determinación de cinc en muestras de orina se aplicó a una muestra de orina de un trabajador expuesto a humos de soldadura a la que se le había adicionado 100  $\mu\text{g/L}$  de Zn.

Una vez obtenidos los datos de estos análisis se calculó el % de Recuperación de la siguiente forma:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

Siendo:

A: [Zn] en la muestra + [Zn] añadida

(valor calculado experimentalmente)

B: [Zn] en la muestra (valor calculado experimentalmente)

C: [Zn] añadida

El resultado obtenido para la recuperación analítica es del 98,7%. Por tanto, es una recuperación cuantitativa.

#### 7.3.7.- Recta de Adición

Para comprobar si existe efecto matriz se utilizó la técnica de las adiciones estándar. Para ello se analizó una muestra de orina a la que se le adicionaron distintas concentraciones de cinc (entre 0-500 µg/L).

Con los resultados de absorbancia obtenidos se trazó la recta de adición (Figura 93).

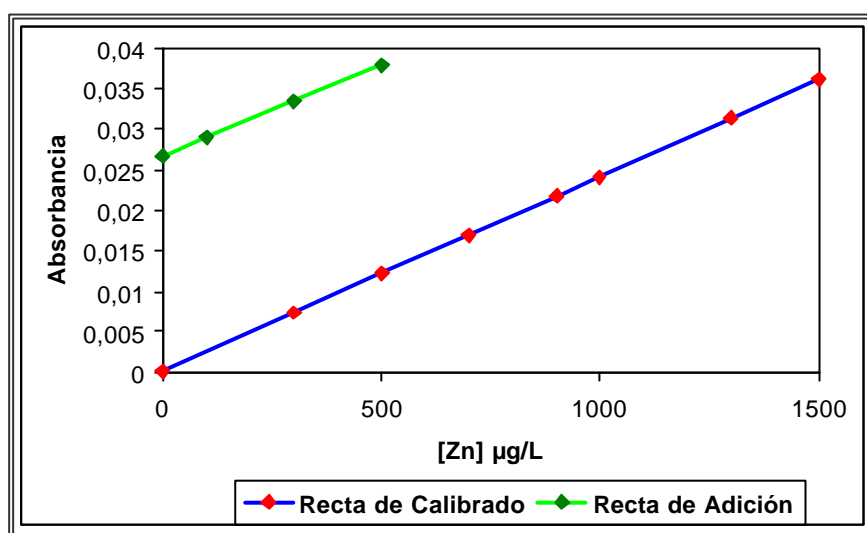


Figura 93.- Recta de adición para el Zn

$$A = 2,4 \times 10^{-5} (\text{Zn}, \mu\text{g/L}) + 0,014;$$

$$r = 0,999$$

En la Figura 93 (se observa que ambas rectas (calibrado y adición) son totalmente paralelas. Este paralelismo entre ambas rectas se comprueba estadísticamente (test t, nivel de confianza 95%) mediante el programa ULC (Univariate Linear Calibration) [208]. Por tanto, no tiene lugar ningún efecto matriz. Así, se puede calcular la concentración de cinc directamente en las muestras utilizando la recta de calibrado.

#### 7.3.8.- Frecuencia de Muestreo

Se calculó la frecuencia de muestreo del método propuesto, para ello se tuvo en cuenta el tiempo que tarda en llegar la muestra diluida al detector

(40s). De esta manera, la frecuencia de muestreo para la determinación de cinc en muestras de orina por el método propuesto es de 90 muestras/h.

#### 7.4.- Aplicación del Método Propuesto: Determinación de Zn en Muestras de Orina

La metodología propuesta se aplicó a muestras de orina procedentes de trabajadores expuestos a humos de soldadura y de personas control (de personas no expuestas a humos de soldadura). Estas muestras se tomaron según lo indicado previamente en la página 307, y se conservaron en nevera. Las muestras se analizaron por triplicado con el sistema FIA propuesto, y en las condiciones óptimas.

Los resultados obtenidos para la orina de trabajadores expuestos a humos de soldadura se muestran en la Tabla CXVII y los obtenidos para la orina control en la Tabla CXVIII.

Tabla CXVII.- Concentración de Zn en muestras de orina de trabajadores expuestos a humos de soldadura

Nº de muestra	Puesto de Trabajo	[Zn] en orina (media $\pm$ s) ( $\mu\text{g/L}$ )
1	Soldador	750,0 $\pm$ 0,0
2	Soldador	825,7 $\pm$ 24,0
3	Soldador	847,2 $\pm$ 24,0
4	Soldador	845,0 $\pm$ 24,0
5	Mecánico	666,7 $\pm$ 0,0
6	Electricista	708,3 $\pm$ 0,0
7	Personal técnico	569,4 $\pm$ 0,0

Tabla CXVIII.- Concentración de Zn en muestras de orina control

Nº de muestra	[Zn] en orina (media $\pm$ s) ( $\mu\text{g/L}$ )
1	375,0 $\pm$ 0,0
2	569,4 $\pm$ 24,0
3	333,3 $\pm$ 0,0
4	458,3 $\pm$ 0,0
5	569,4 $\pm$ 24,0
6	291,7 $\pm$ 0,0
7	416,7 $\pm$ 24,0

Como se puede observar en las Tablas CXVII y CXVIII y en la Figura 94, la concentración de Zn en las muestras de orina analizadas es mayor para aquellas muestras pertenecientes a trabajadores expuestos a humos de soldadura. Los valores más altos se encuentran en la orina de los trabajadores directamente expuestos (soldadores). Sin embargo, ninguna muestra supera el valor considerado como normal para el Zn en orina de personas no directamente expuestas a humos metálicos (Tabla VI, p.52).

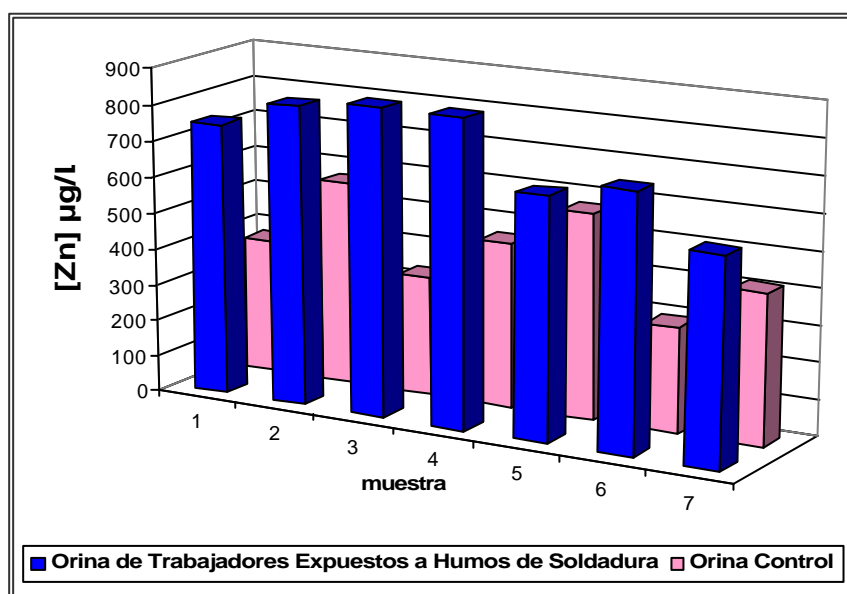


Figura 94.- Resultados Zn en orina





## **Capítulo VII.-**

### ***Conclusiones***





A la vista del trabajo experimental desarrollado y recogido en esta Memoria, se presentan las siguientes conclusiones:

- ✓ En este trabajo de investigación se han desarrollado, optimizado y validado métodos analíticos automáticos basados en sencillos sistemas de análisis por inyección en flujo (FIA) que han permitido la determinación de metales por espectroscopía de absorción atómica en muestras de aire procedentes del medio ambiente laboral y en muestras biológicas (pelo y orina) de trabajadores expuestos a riesgo químico por humos metálicos. Así, se han propuesto nuevas metodologías analíticas innovadoras, automáticas, rápidas y sencillas que permiten resolver problemáticas analíticas reales relativas a la higiene industrial y más concretamente a la higiene analítica.
- ✓ En todos los métodos descritos en la Memoria se ha aplicado por primera vez sistemas de flujo continuo para realizar todas las etapas incluidas en la determinación de metales en muestras procedentes del medio ambiente laboral.
- ✓ Se ha diseñado y optimizado un sistema FIA que incorpora un dispositivo de extracción continua basado en la energía de ultrasonidos que permite la extracción en medio ácido diluido de los metales de los filtros de captación de aire y de muestras de pelo, y su detección en línea por espectroscopia de absorción atómica con llama.
- ✓ Se ha diseñado y optimizado un sistema FIA que incluye un dispositivo de extracción continua para realizar la extracción de Cr(VI) de los filtros de captación de aire en medio alcalino asistida con energía de ultrasonidos y un sistema de preconcentración en línea utilizando una minicolumna rellena de una resina aniónica (Dowex 1-X8) que permite

la detección continua del cromo hexavalente por espectroscopia de absorción atómica con llama después de ser eluído con una disolución 0,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,1 M  $\text{NH}_3$ , (pH 8,3).

- ✓ Se ha diseñado y optimizado un sistema FIA basado en un sistema de flujo interrumpido (stopped-flow). Este sistema contiene un módulo de digestión en línea que permite realizar a temperatura ambiente el proceso para las muestras de orina bajo la acción de la energía de ultrasonidos y un sistema de preconcentración en línea utilizando una minicolumna rellena de una resina quelatante (Chelite Che, grupos iminodiacético). Así se realiza la detección continua de los metales después de su elución con ácido clorhídrico 3 M por espectroscopia de absorción atómica con llama.
- ✓ Se ha diseñado y optimizado un sistema FIA con el que se consigue realizar la dilución en línea de las muestras de orina con agua ultrapura, y la detección continua de cinc por espectroscopia de absorción atómica con llama.
- ✓ Con la realización de este trabajo se ha contribuido a la simplificación del tratamiento de muestras complejas (filtros de captación de aire, pelo y orina) con las que se trabaja en el ámbito de la higiene analítica. Así, se ha logrado minimizar la participación humana, el tiempo de muestreo de las muestras de aire y el tiempo del análisis de los metales en estos tipos de muestras.
- ✓ El análisis del contenido metálico en el aire del medioambiente laboral llevado a cabo con la metodología propuesta determina que en el punto de muestreo situado cerca de la nariz del soldador es donde se localizan las concentraciones más altas de los metales. Por el contrario, en el punto de muestreo situado a 2 m de donde se realiza la operación de soldadura, las concentraciones de los metales son las más bajas.

- 
- ✓ Al realizar la evaluación del riesgo higiénico debido a la concentración de los metales en el aire del medio ambiente laboral calculándose el porcentaje de "Dosis Máxima Permisible" (%DMP) para cada metal, como el valor calculado nunca es mayor que 100, se puede decir que no existe riesgo higiénico para ninguno de los metales. Aunque para el cadmio, manganeso y níquel el %DMP > 50, por lo que existe riesgo higiénico dudoso. Por tanto, se deberían realizar mediciones higiénicas de estos metales de manera periódica para controlar que el valor de %DMP no se incrementa. También se observa que las concentraciones de todos los metales en todos los puntos de muestreo son menores que los VLA-ED. Sin embargo, si se considera que los efectos para la salud del trabajador son aditivos, ya que la inhalación de polvo o humos metálicos puede originar fiebre de humos metálicos, existe riesgo higiénico (%DMP = 4,5).
  
  - ✓ En el caso de la determinación de Cr(VI) en humos de soldadura, también ocurre que en el punto de muestreo situado cerca de la nariz del soldador es donde se localizan las concentraciones más altas de Cr(VI), y en el punto de muestreo localizado a 2 m de donde se realiza la operación de soldadura, la concentración Cr(VI) determinada es la más baja. En ninguna de las muestras analizadas se supera el VLA-ED establecido para los compuestos solubles e insolubles de Cr(VI) (50 y 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , respectivamente).
  
  - ✓ Se ha calculado que la concentración de Cr(VI) en los humos de soldadura corresponde a un valor entre 1,1 - 1,6 % del cromo total.
  
  - ✓ La concentración metálica en las muestras de pelo obtenida al ser analizadas por el método propuesto es mayor para aquellas muestras pertenecientes a trabajadores expuestos a humos de soldadura. Sobre todo, para el pelo de los trabajadores directamente expuestos

(soldadores). Sin embargo, solamente para el cromo, cobalto y el manganeso en alguna muestra la concentración encontrada supera el valor considerado como normal para el pelo de personas no directamente expuestas a humos metálicos.

- ✓ La concentración de los metales en las muestras de orina analizadas es mayor para aquellas muestras pertenecientes a trabajadores expuestos a humos de soldadura, aunque esto ocurre menos marcadamente en el caso del hierro. Los valores más altos se encuentran en la orina de los trabajadores directamente expuestos (soldadores). Sin embargo, sólo en el caso del níquel y plomo, alguna muestra supera el valor considerado como normal para la orina de personas no directamente expuestas a humos metálicos. En el caso del Cr, para la orina de trabajadores expuestos, la concentración encontrada supera en algunos casos el VLB.



## **Bibliografía**



- 
- [1] J. W. CHERRIE. The beginning of the science underpinning occupational hygiene. *Ann. Occup. Hyg.*, 47 (2003) 179-185.
- [2] J.M. CORTÉS DÍAZ, Técnicas de Prevención de Riesgos Laborales, (6ª edición) Ed. Tébar, Madrid (2003).
- [3] F. MENÉNDEZ DÍAZ, Higiene Industrial. Manual para la Formación del Especialista, Ed. Lex Nova, Valladolid (2002).
- [4] M. J. FALAGÁN ROJO, Higiene Industrial Aplicada, Ed. Fundación Luis Fernández Velasco, Oviedo (2001).
- [5] R.E. KORCZYNSKI, Occupational health concerns in the welding industry. *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, 15 (2000) 936-945.
- [6] M.D. TAYLOR, J.R. ROBERTS, S.S. LEONARD, X. SHI, J.M. ANTONINI, Effects of welding fumes of differing composition and solubility on free radical production and acute lung injury and inflammation in rats. *Toxicol. Sci.*, 75 (2003) 181-191.
- [7] J.D. McNEILLY, M.R. HEAL, I.J. BEVERLAND, A.HOWE, M.D. GIBSON, L.R. HIBBS, W. MacNEE, K. DONALDSON, Soluble transition metals cause the pro-inflammatory effects of welding fumes in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 196 (2004) 95-107.
- [8] J.J. MOULIN, Soudage et risque de cancers broncho-pulmonaires (Welding and risks of lung cancer). *Fr. Souder*, 22 (1998) 21-26.
- [9] M. GERIN, A.C. FLETCHER, C. GRAY, R. WINKELMANN, P. BOFFETTA, L. SIMONATO, Development and use of a welding process exposure matrix in a historical prospective study of lung cancer risk in European welders. *Int. J. Epidemiol.*, 22 (1993) 22-28.
- [10] R.M. STERN, Assessment of risk of lung cancer for welders. *Arch. Environ. Health*, 38 (1983) 148-155.
- [11] K. DANADEVI, R. ROZATI, B.S. BANU, P. GROVER, Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the Comet and micronucleus assays. *Mutagenesis*, 19 (2004) 35-41.
- [12] RD 1124/2000, de 16 de junio, por el que se modifica el Real Decreto 665/1997, de 12 de mayo, sobre Protección de los Trabajadores contra los Riesgos Relacionados con la Exposición a Agentes Cancerígenos durante el Trabajo (BOE 17-06-2000).

- 
- [13] F. BRUGNONE, L. PERBELLINI, E. GAFFURI, Evaluation of the metal pollution from welding work. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 17 (1981) 481-484.
- [14] C. BOTTA, G. IARMARCOVAI, F. CHASPOUL, I. SARI-MINODIER, J. POMPILI, T. ORSIERE, J. L. BERGE-LEFRANC, A. BOTTA, P. GALLICE, M. DE MEO, Assessment of occupational exposure to welding fumes by inductively coupled plasma-mass spectroscopy and by the alkaline comet assay. *Environ Mol Mutagen*, 47 (2006) 284-295.
- [15] R.K. TANDON, P.T. CRISP, J. ELLIS, R.S. BAKER, Fume generation and melting rates of shielded metal arc welding electrodes. *Australian Welding J.*, 28 (1983) 27-30.
- [16] T. MORI, A. MATSUDA, S. AKASHI, M. OGATA, K. TAKEOKA, M. YOSHINAKA, The three dimensional distribution of chromium and nickel alloy welding fumes. *Acta Medica Okayama*, 45 (1991) 233-240.
- [17] P. CARRER, M. MARONI, A. FARULLA, S. SIMONAZZI, R. IACHETTA, Efficacia delle misure di prevenzione personale nel contenimento della esposizione a metalli dei saldatori. *Medicina del Lavoro*, 83 (1992) 587-595.
- [18] J.T. KARLSEN, T. TORGRIMSEN, S. LANGAARD, G. FARRANTS, A. REITH, Exposure to solid aerosols during TIG and MIG/MAG welding on stainless steel. *Occup. Hyg.*, 3 (1996) 377-387.
- [19] P.J. TSAI, M.A. WERNER, J.H. VINCENT, G. MALDONADO, Worker Exposures to nickel-containing aerosol in two electroplating shops: comparison between inhalable and total aerosol. *Appl. Occup. and Environ. Hyg.*, 11 (1996) 484-492.
- [20] H.R. CASTNER, C.L. NULL, Chromium, nickel and manganese in shipyard welding fumes. *Welding Res.* (1998) 223s-231s.
- [21] H. SAITO, J. OJIMA, M. TAKAYA, T. IWASAKI, N. HISANAGA, S. TANAKA, H. ARITO, Laboratory measurement of hazardous fumes and gases at a point corresponding to breathing zone of a welder during CO<sub>2</sub> arc welding *Ind. Health*, 38 (2000) 69-78.
- [22] K. BROWN, Fume composition related to welding process and consumables. *Welding in the World*, 44 (2000) 39-40.



- 
- [23] J. OJIMA, N. SHIBATA, T. IWASAKI, Laboratory evaluation of welder's exposure and efficiency of air duct ventilation for welding work in a confined space. *Ind. Health*, 38 (2000) 24-29.
- [24] N. SHIBATA, M. TANAKA, J. OJIMA, T. IWASAKI, Numerical simulations to determine the most appropriate welding and ventilation conditions in small enclosed workspace. *Ind. Health*, 38 (2000) 356-365.
- [25] K.H. SCHALLER, G. CSANADY, J. FILSER, B. JUENGERT, H. DREXLER, Elimination kinetics of metals after an accidental exposure to welding fumes. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 80 (2007) 635-641.
- [26] RD 374/2001, de 6 de abril, sobre Protección de la Salud y Seguridad de los Trabajadores contra Riesgos Relacionados con los Agentes Químicos durante el Trabajo (BOE 01-05-2001).
- [27] INSHT (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo), Límites de Exposición profesional para Agentes Químicos, Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Madrid (2007).
- [28] E. MERIAN, Metals and Their Compounds in the Environment, Ed. VCH, Weinheim (1991).
- [29] M. STOEPPLE, Hazardous Metals in the Environment, Ed. Elsevier, Amsterdam (1992)
- [30] G. NORDBERG, Metales: Propiedades Químicas y Toxicidad, en Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo (3ª Ed.) Organización Internacional del Trabajo, O.I.T. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. (Cap. 63) (2001). <http://www.mtas.es/Publica/enciclo/>
- [31] A.LAFUENTE, A. GONZALEZ-CARRACEDO, A. ROMERO, T. CABALEIRO, A.I. ESQUIFINO, Toxic effects of cadmium on the regulatory mechanism of dopamine and serotonin on prolactin secretion in adult male rats. *Toxicol. Lett.*, 155 (2005) 87-96.
- [32] T. JIN, O. KONG, T. YE, X. WU, G.N. NORDBERG, Renal dysfunction of cadmium-exposed workers residing in a cadmium-polluted environment. *BioMetals*, 17 (2004) 513-518.
- [33] R.A. GOYER, J. LIU, M.P. WAALKES, Cadmium and cancer of prostate and testis. *BioMetals*, 17 (2004) 555-558.

- 
- [34] W. UTER, R. RUEHL, A. PFAHLBERG, J. GEIER, A. SCHNUCH, O. GEFELLER, Contact allergy in construction workers: results of a multifactorial analysis. *Ann. Occup. Hyg.*, 48 (2004) 21-27.
- [35] J.M. FINE, T. GORDON, L. CHEN, P. KINNEY, G. FALCONE, J. SPARER, W.S. BECKETT, Characterization of clinical tolerance to inhaled zinc oxide in naive subjects and sheet metal workers. *J. Occup. Environ. Med.*, 42 (2000) 1085-1091.
- [36] G. NORDBERG, Assessment of risks in occupational cobalt exposures. *Sci. Total Environ.*, 150 (1994) 201-207.
- [37] E. PERSSON, J. HENRIKSSON, H. TJALVE, Uptake of cobalt from the nasal mucosa into the brain via olfactory pathways in rats. *Toxicol. Lett.* 145 (2003) 19-27.
- [38] L. GERHARDSSON, V. ENGLYST, N. LUNDSTROM, S. SANDBERG, G. NORDBERG, Cadmium, copper and zinc in tissues of deceased copper smelter workers. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 16 (2002) 261-266.
- [39] N. SHIRAIISHI, Copper-binding proteins and neurodegenerative diseases: Prion disease and Alzheimer's disease. *Biomed. Res. Trace Elements*, 13 (2002) 18-24.
- [40] R. M. CESPÓN, M. C. YEBRA, M. P. BERMEJO, Preconcentration and speciation of chromium by the determination of total chromium and chromium(III) in natural waters by flame atomic absorption spectrometry with a chelating ion-exchange flow injection system. *Anal. Chim. Acta*, 327 (1996) 37-45.
- [41] J.A.J. VANOIRBEEK, P. H. M. HOET, B. NEMERY, E.K. VERBEKEN, H.V. DOSMAN, D. LISON, D. DINSDALE, Kinetics of an intratracheally administered chromium catalyst in rats. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, 66 (2003) 393-409.
- [42] C.P. RAO, S.P. KAIWAR, M.S.S. RAGHAVAN, Chromium toxicity. Spectral and electrochemical studies of Cr(VI) reduction by biomimicking molecules. *Int. J. Environ. Studies*, 54 (1998) 131-144.
- [43] M. CIESLAK-GOLONKA, Toxic and mutagenic effects of chromium(VI). *Polyhedron*, 15 (1996) 3667-3689.
- [44] R.S. BRITTON, K.L. LEICESTER, B.R. BACON, Iron toxicity and chelation therapy. *Int. J. Hematol.*, 76 (2002) 219-228.

- 
- [45] H. AHN, K. HWANG, Y. KIM, G. LEE, S. LEE, K. AHN, B. LEE, Different effects of serum iron status on the relationship between blood lead and zinc protoporphyrin in lead workers in Korea. *J. Occup. Health*, 41 (1999) 166-171.
- [46] J. M. ANTONINI, A. B. SANTAMARIA, N. T. JENKINS, E. ALBINI, R. LUCCHINI, Fate of manganese associated with the inhalation of welding fumes: Potential neurological effects. *NeuroToxicol.*, 27 (2006) 304-310.
- [47] W.W. BARRINGTON, C.R. ANGLE, N.K. WILLCOCKSON, M.A. PADULA, T. KORN, Autonomic function in manganese alloy workers. *Environ. Res.* 78 (1998) 50-58.
- [48] B.A. RACETTE, L. MCGEE, S.M. MOERLEIN, J.W. MINK, T.O. VIDEEN, J.S. PERLMUTTER, Welding-related parkinsonism. Clinical features, treatment, and pathophysiology. *Neurology*, 56 (2001) 8-12.
- [49] A. SMARGIASSI, M. BALDWIN, S. SAVARD, G. KENNEDY, D. MERGLER, J. ZAYED, Assessment of exposure to manganese in welding operations during the assembly of heavy excavation machinery accessories. *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, 15 (2000) 746-750.
- [50] I.J. YU, J.D. PARK, E.S. PARK, K.S. SONG, K.T. HAN, J.H. HAN, Y.H. CHUNG, B.S. CHOI, K.H. CHUNG, M.H. CHO, Manganese distribution in brains of sprague-dawley rats after 60 days of stainless steel welding-fume exposure. *NeuroToxicol.*, 24(2003) 777-785.
- [51] R.M.BOWLER, H.A. ROELS, S. NAKAGAWA, M. DREZGIC, E. DIAMOND, R. PARK, W. KOLLER, R.P. BOWLER, D. MERGLER, M. BOUCHARD, D. SMITH, R. GWIAZDA, R.L. DOTY, Dose–effect relationships between manganese exposure and neurological, neuropsychological and pulmonary function in confined space bridge welders. *Occup. Environ. Med.*, 64 (2007) 167-177.
- [52] H.A. ROELS, M.I. ESLAVA, E. CEULEMANS, A. ROBERT, D. LISON, Prospective study on the reversibility of neurobehavioral effects in workers exposed to manganese dioxide. *NeuroToxicol.*, 20(1999) 255-271.
- [53] R.M. STERN, Process-Dependent Risk of Delayed Health Effects for Welders. *Environ. Health Perspec.*, 41 (1981) 235-253.

- 
- [54] H. SCHELLHAS, Possible danger caused by chrome-nickel steel dust. *Prophylaxe und Ergonomie*, 34 (1984) 144-147.
- [55] H. KESKINEN, P.L. KALLIOMAKI, K. ALANKO, Occupational asthma due to stainless steel welding fumes. *Clin. Allergy*, 10 (1980) 151-159.
- [56] P.L. KALLIOMAKI, E. RAHKONEN, V. VAARANEN, K. KALLIOMAKI, K. AITTONIEMI, Lung-retained contaminants, urinary chromium and nickel among stainless steel welders. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 49 (1981) 67-75.
- [57] R. HICKS, K.J. AL-SHAMMA, H.F. LAM, P.J. HEWITT, An investigation of fibrogenic and other toxic effects of arc-welding fume particles deposited in the rat lung. *J. Appl. Toxicol.*, 3 (1983) 297-306.
- [58] P.L. KALLIOMAKI, M.L. JUNTILA, K. KALLIOMAKI, E.L. LAKOMAA, R. KIVELA, Comparison of the retention and clearance of different welding fumes in rat lungs. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 44 (1983) 733-738.
- [59] S.K. RASTOGI, B.N. GUPTA, T. HUSAIN, S. SRIVASTAVA, Pulmonary function evaluation of welders. *Indian J. Environ. Protect.*, 11 (1991) 648-653.
- [60] Ch. R. LEE, Ch. I. YOO, J.H. LEE, S.K. KANG, Nasal septum perforation of welders. *Ind. Health*, 40 (2002) 286-289.
- [61] S.R. BERGE, K. SKYBERG, Radiographic evidence of pulmonary fibrosis and possible etiologic factors at a nickel refinery in Norway. *J. Environ. Monit.*, 5 (2003) 681-688.
- [62] J. ANTONINI, M. TAYLOR, A. ZIMMER, J. ROBERTS, Pulmonary responses to welding fumes: Role of metal constituents. *J. Toxicol. and Environ. Health, Part A*, 67 (2004) 233-249.
- [63] E. RAHKONEN, M.L. JUNTILA, P.L. KALLIOMAKI, M. OLKINUORA, M. KOPONEN, K. KALLIOMAKI, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 52 (1983) 243-255.
- [64] J. ANGERER, G. LEHNERT, Occupational chronic exposure to metals. II. Nickel exposure of stainless steel welders (biological monitoring). *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 62 (1990) 7-10.
- [65] I. C. STRIDSKLEV, B. HEMMINGSEN, K.H. SCHALLER, H.J. RAITHEL, S. LANGAARD, Biological monitoring of chromium and nickel among stainless welder using the tungsten inert gas-method. *J. Occup. Med. and Toxicol.*,

- 3 (1994) 43-55.
- [66] C.P. YU, T.H. HSIEH, A.R. OLLER, G. OBERDORSTER, Evaluation of the human nickel retention model with workplace data. *Reg. Toxicol. and Pharmacol.*, 33 (2001) 165-172.
- [67] H. GURER-ORHAN, H.U. SABIR, H. OEZGUNES, Correlation between clinical indicator of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead exposed workers. *Toxicology*, 195 (2004) 147-154.
- [68] V.M. WEAVER, B.K. LEE, K.D. AHN, G.S. LEE, A.C. TODD, W.F. STEWART, J. WEN, D.J. SIMON, P.J. PARSONS, B.S. SCHWARTZ, Associations of lead biomarkers with renal function in Korean lead workers. *Occup. Environ. Med.*, 60 (2003) 551-562.
- [69] V. WANG, M. LEE, M. J. CHIOU, C. GUU, C. WU, T. WU, J. LAI, Relationship between blood lead levels and renal function in lead battery workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 75 (2002) 569-575.
- [70] S. TELISMAN, A. PIZENT, J. JURASOVIC, P. CVITKOVIC, Lead effect on blood pressure in moderately lead-exposed male workers. *Am. J. Ind. Med.*, 45 (2004) 446-454.
- [71] D. G. ELLINGSEN, L. DUBEIKOVSKAYA, K. DAHL, M. CHASHCHIN, V. CHASHCHIN, E. ZIBAREVB, Y. THOMASSEN, Air exposure assessment and biological monitoring of manganese and other major welding fume components in welders. *J. Environ. Monit.*, 8 (2006) 1078-1086.
- [72] B. W. MORRIS, H. GRIFFINS, C.A. HARDISTY, G.J. KEMP, Increased concentrations of chromium in plasma, urine, and red blood cells in a group of stainless steel welders. *At. Spectrosc.*, 10 (1989) 1-3.
- [73] W.M. DRAPER, K. ASHLEY, C.R. GLOWACKI, P.R. MICHAEL, Industrial Hygiene Chemistry: Keeping pace with rapid change in the workplace. *Anal. Chem.*, 71 (1999) 33R-60R.
- [74] M. JAKUBOWSKI, M. TRZCINKA-OCHOCKA, Biological monitoring of exposure: trends and key developments. *J. Occup. Health*, 47 (2005) 22-48.
- [75] S. CAROLI, A. ALIMONTI, E. CONI, F. PETRUCCI, O. SENOFONTE, N. VIOLANTE, The assessment of reference values for elements in human biological tissues and fluids: A systematic review. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 24 (1994) 363-398.

- 
- [76] M. SCHUHMACHER, J.L. DOMINGO, M.C. AGRAMUNT, A. BOCIO, L. MUELLER, Biological monitoring of metals and organic substances in hazardous waste incineration workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 75 (2002) 500-506.
- [77] A. SUKUMAR, R. SUBRAMANIAN, Elements in the hair of non-mining workers of a lignite open mine in Neyveli. *Ind. Health*, 41 (2003) 63-68.
- [78] G.J. EVANS, R.E. JERVIS, Hair as bioindicator. Limitations and complications in the interpretation of results. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 110 (1987) 613-625.
- [79] M. A. B. C. MENEZES, E. C. P. MAIA, C. C. B. ALBINATI, C. V. S. SABINO, J. R. BATISTA, How suitable are scalp hair and toenail as biomonitors?. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 259 (2004) 81-86.
- [80] D.R. TRIGER, W. CROWE, M.J. ELLIS, J.P. HERBERT, C.E. McDONNELL, B.B. ARGENT, Trace elements levels in the blood of workers in two steel works and a non ferrous plant handling lead and cadmium compared with a non exposed population. *Sci. Total Environ.*, 78 (1989) 241-61.
- [81] J. KUCERA, V. BENCKO, J. TEJRAL, L. BORSKA, L. SOUKAL, Z. RANDA, Biomonitoring of occupational exposure: Neutron activation determination of selected metals in the body tissues and fluids of workers manufacturing stainless steel vessels. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 259 (2004) 7-11.
- [82] B. NOWAK, J. CHMIELNICKA, Relationship of lead and cadmium to essential elements in hair, teeth, and nails of environmentally exposed people. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46 (2000) 265-274.
- [83] R. MEHRA, M. JUNEJA, Fingernails as biological indices of metal exposure. *J. Biosci.*, 30 (2005) 253-257.
- [84] Norma UNE 81-587-94. Calidad del aire. Atmósferas en el puesto de trabajo. Determinación de metales y sus compuestos iónicos en el aire. Métodos de Ensayo para Evaluar los Riesgos Producidos por Sustancias Peligrosas en el Lugar de Trabajo. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). Madrid, 1999.
- [85] Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, MTA/MA-025/A92- Determinación de Metales y sus Compuestos Iónicos en Aire-Método de

- Filtro de Membrana/Espectrofotometría de Absorción Atómica.  
[http://www.mtas.es/insht/mta/MA\\_025\\_A92.htm](http://www.mtas.es/insht/mta/MA_025_A92.htm)
- [86] Occupational Safety & Health Administration (OSHA), Manual of Sampling and Analytical Methods, ID-121. <http://www.osha-slc.gov/>.
- [87] US National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH, Manual of Analytical Methods, US Government Printing Office, 4<sup>th</sup> ed., Washington, 1994.
- [88] Occupational Safety & Health Administration (OSHA), Manual of Sampling and Analytical Methods, ID-125. <http://www.osha-slc.gov/>.
- [89] Health and Safety Executive, Methods for the Determination of Hazardous Substances. HSE Books, London, 1996.
- [90] A.M. PAUDYN, R.G. SMITH, Applications of inductively coupled plasma atomic emission spectrometry in occupational health. *J. Anal. At Spectrom.*, 5 (1990) 523-529.
- [91] A.M. PAUDYN, R.G. SMITH, Microwave decomposition of dusts, ashes, and sediments for the determination of elements by ICP-AES. *Can. J. Appl. Spectrosc.*, 37 (1992) 94-99.
- [92] O.T. BUTLER, A.M. HOWE, Development of an international standard for the determination of metals and metalloids in workplace air using ICP-AES: evaluation of sample dissolution procedures through an interlaboratory trial. *J. Environ. Monit.*, 1 (1999) 23-32.
- [93] K. SWAMI, C.D. JUDD, J. ORSINI, K.X. YANG, L. HUSAIN, Microwave assisted digestion of atmospheric aerosol samples followed by inductively coupled plasma mass spectrometry determination of trace elements. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 369 (2001) 63-70.
- [94] L. FUICHTJOHANN, N. JAKUBOWSKI, D. GLADTKE, D. KLOCKO, J. BROEKAERT, Speciation of nickel in airborne particulate matter by means of sequential extraction in a micro flow system and determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Environ. Monit.*, 3 (2001) 681-687.
- [95] P. KULKARNI, S. CHELLAM, G. GHURYE, M.P. FRASER, In situ generation of hydrofluoric acid during microwave digestion of atmospheric particulate matter prior to trace element analysis using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Environ. Eng. Sci.*, 20 (2003) 517-531.

- 
- [96] F. CARIATI, P. FERMO, S. GILARDONI, Optimization of an urban particulate matter multielement analysis method by inductively coupled plasma: Atomic emission spectrometry (ICP-AES). *Annali di Chim. (Rome)*, 93 (2003) 539-550.
- [97] M. VALCÁRCEL, M.D. LUQUE DE CASTRO, Non-chromatographic Continuous Separation Techniques, The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1991).
- [98] M.D. LUQUE DE CASTRO, Preliminary steps of the analytical process. From sampling to detection. *Pure Appl. Chem.*, 2 (2002) 2293-2298.
- [99] J.L. LUQUE GARCÍA, M.D. LUQUE DE CASTRO, Acceleration and Automation of Solid Sample Treatment, Elsevier, Amsterdam (2002).
- [100] S. MITRA (ed.), Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, John Willey & Sons, New York (2003).
- [101] F. PRIEGO-CAPOTE, M.D. LUQUE DE CASTRO, Analytical uses of ultrasound. I. Sample preparation. *Trends Anal. Chem.*, 23 (2004) 644-653.
- [102] F. PRIEGO-CAPOTE, M.D. LUQUE DE CASTRO, Ultrasound in analytical chemistry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (2007) 249-257.
- [103] K. ASHLEY, Ultrasonic extraction and field portable anodic stripping voltammetry of lead from environmental samples. *Electroanalysis*, 7 (1995) 1189-1192.
- [104] K. ASHLEY, M. HUNTER, L.H. TAIT, J. DOZIER, J.L. SEAMAN, P.F. BERRY, Field investigation of on-site techniques for the measurement of lead in paint films. *Field. Anal. Chem. Technol.*, 2 (1998) 39-50.
- [105] K. ASHLEY, R. SONG, C.A. ESCHE, P.C. SCHLECHT, P.A. BARON, T.J. WISE, Ultrasonic extraction and portable anodic stripping voltammetric measurement of lead in paint, dust wipes, soil, and air: An interlaboratory evaluation. *J. Environ. Monit.*, 1 (1999) 459-464.
- [106] A.A.A. HAMEED, M.I. KHODER, Evaluation of airborne lead in the welding working environment. *J. Environ. Monit.*, 2 (2000) 119-121.
- [107] K. ASHLEY, T.J. WISE, W. MERCADO, D.B. PARRY, Ultrasonic extraction and field portable anodic stripping voltammetric measurement of lead in dust wipe samples. *J. Hazard. Mat.*, 83 (2001) 41-50.



- 
- [108] A. SUSSELL, K. ASHLEY, Measurement of lead in workplace air and paint chip samples by ultrasonic extraction and portable anodic stripping voltammetry. *J. Environ. Monit.*, 4 (2002) 156-161.
- [109] K. ASHLEY, Ultrasonic extraction of heavy metals from environmental and industrial hygiene samples for their subsequent determination. *Trends Anal. Chem.*, 17 (1998) 366-372.
- [110] K. ASHLEY, R.N. ANDREWS, L. CAVAZOS, M. DEMANGE, Ultrasonic extraction as a sample preparation technique for elemental analysis by atomic spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 16 (2001) 1147-1153.
- [111] Department of Labor Occupational Safety & Health Administration. Hexavalent Chromium In Workplace Atmospheres: <http://www.osha.gov/dts/sltc/methods/inorganic/id215/id215.html>
- [112] The National Institute for Occupational Safety and Health. Chromium hexavalent: <http://www.cdc.gov/niosh/nmam/pdfs/7600.pdf>
- [113] The National Institute for Occupational Safety and Health. Chromium hexavalent by ion chromatography: <http://www.cdc.gov/niosh/nmam/pdfs/7605.pdf>
- [114] The National Institute for Occupational Safety and Health. Chromium hexavalent by field-portable spectrophotometry: <http://www.cdc.gov/niosh/nmam/pdfs/7703.pdf>
- [115] A. CHATT, S.A. KATZ, Hair Analysis, Applications in the Biomedical and Environmental Sciences, VCH Publishers, New York (1988).
- [116] D. POZEBON, V.L. DRESSLER, A.J. CURTIUS, Hair analysis: a review on the procedures for the determination of trace elements and applications. *Quim. Nova*, 22 (1999) 838-846.
- [117] J. MORTON, V.A. CAROLAN, P.H.E. GARDINER, Removal of exogenously bound elements from human hair by various washing procedures and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.*, 455(2002) 23-34.
- [118] Y.S. RYABUKIN, Activation Analysis of Hair as an Indicator of Contamination of Man by Environmental Trace Element Pollutants. IAEA Report IAEA/RL/50, Vienna (1978).
- [119] Y.S. RYABUKIN, Nuclear-based methods for the analysis of trace element pollutants in human hair. *J. Radioanal Chem.*, 60 (1980) 7-30.

- 
- [120] A.A. ALMEIDA, X. JUN, J. L.F.C. LIMA, Determination of transition metals in human hair by high-performance liquid chromatography using sodium hexadecane-sulfonate coated columns. *Talanta*, 50 (1999) 253-259.
- [121] M.H. POURNAGHI-AZAR, H. DASTANGOO, Differential pulse anodic stripping voltammetry of copper in dichloromethane: application to the analysis of human hair. *Anal. Chim. Acta.*, 435 (2000) 135-144.
- [122] M.Y. KAMOGAWA, A.R.A. NOGUEIRA, M. COSTA, E.E. GARCIA, J.A. NOBREGA, A new strategy for preparation of hair slurries using cryogenic grinding and water-soluble tertiary-amines medium. *Spectrochim. Acta*, 56B(2001) 1973-1980.
- [123] K. SREENIVASA RAO, T. BALAJI, T. PRASADA RAO, G.R.K. NAIDU, Determination of iron, cobalt, nickel, manganese, zinc, copper, cadmium and lead in human hair by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Spectrochim. Acta*, 57B(2002) 1333-1338.
- [124] J.L. MANZOORI, A.B. BAVILI-TABRIZI, Cloud point preconcentration and flame atomic absorption spectrometric determination of Cd and Pb in human hair. *Anal. Chim. Acta*, 470 (2002) 215-221.
- [125] G. KEFALA, A. ECONOMOU, A. VOULGAROPOULOS, M. SOFONIOU, A study of bismuth-film electrodes for the detection of trace metals by anodic stripping voltammetry and their application to the determination of Pb and Zn in tapwater and human hair. *Talanta*, 61 (2003) 603-610.
- [126] R. PEREIRA, R. RIBEIRO, F. GONCALVES, Scalp hair analysis as a tool in assessing human exposure to heavy metals (S. Domingos mine, Portugal). *Sci.Total Environ.* 327 (2004) 81-92.
- [127] S. GAUTAM; S. RAMESH, R. TARIT C. DIPANKAR, Arsenic and other elements in hair, nails, and skin-scales of arsenic victims in West Bengal, India. *Sci Total Environ.*, 326 (2004) 33-47.
- [128] R. SHARMA, L.C. SINGH, S. TANVEER, S. VERGHESE, A. KUMAR, Trace element contents in human head hair of residents from Agra City, India. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72 (2004) 530-534.
- [129] T. OHNO, A. SHINOHARA M. CHIBA, T. HIRATA, Precise Zn Isotopic Ratio Measurements of Human Red Blood Cell and Hair Samples by Multiple Collector-ICP-Mass Spectrometry. *Anal. Sci.*, 21 (2005) 425-428.

- 
- [130] F. SHEMIRANI, M. BAGHDADIA, M. RAMEZANI, Preconcentration and determination of ultra trace amounts of arsenic(III) and arsenic(V) in tap water and total arsenic in biological samples by cloud point extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 65 (2005) 882-887.
- [131] R. WIETECH, P. KOSCIELNIAK, T. LECH, T. KIELAR, Simple Method for Simultaneous Determination of Selenium and Arsenic in Human Hair by Means of Atomic Fluorescence Spectrometry with Hydride Generation Technique. *Microchim. Acta*, 149 (2005) 137-144.
- [132] F. SHEMIRANI, M. BAGHDADI, M. RAMEZANI, M.R. JAMALI, Determination of ultra trace amounts of bismuth in biological and water samples by electrothermal atomic absorption spectrometry (ET-AAS) after cloud point extraction. *Anal. Chim. Acta*, 534 (2005) 163-169.
- [133] J. STUPAR, F. DOLINSEK, Determination of chromium, manganese, lead and cadmium in biological samples including hair using direct electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta*, 51B (1996) 665-683.
- [134] S. D' ILIO, N. VIOLANTE, O. SENOFONTE, S. CAROLI, Occupational exposure of goldsmith workers of the area of Rome to potentially toxic metals as monitored through hair analysis. *Microchem J.*, 67 (2000) 343-349.
- [135] F. PETRUCCI, N. VIOLANTE, O. SENOFONTE, M. DE GREGORIO, A. ALIMONTI, S. CAROLI, G. FORTE, A. CRISTAUDO, Development of an analytical method for monitoring worker populations exposed to platinum-group elements. *Microchem J.*, 76 (2004) 131-140.
- [136] M.H. SOROURADDIN, J.L. MANZOORI, M. IRANIFAM, Determination of copper(II) based on its catalytic effect on thiosemicarbazide-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-CTMAB chemiluminescence reaction. *Talanta*, 66 (2005) 1117-1121.
- [137] X. DONG, Y. NAKAGUCHI, K. HIRAKI, Determination of chromium, copper, iron, manganese and lead in human hair by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Anal. Sci.*, 14 (1998) 785-789.
- [138] M. B. MOKHTAR, A. B. AWALUDDIN, A. B.B.M. YUSOF, B.B. BAKAR, Lead in blood and hair of shipyard workers, Sabah, Malaysia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 69 (2002) 8-14.

- 
- [139] J. DOMBOVÁRI, L. PAPP, Comparison of Sample Preparation Methods for Elemental Analysis of Human Hair. *Microchem. J.*, 59 (1998) 187-193.
- [140] A. STURARO, G. PARVOLI, L. DORETTI, S. ZANCHETTA, G. ALLEGRI, G. BATTISTON, Simultaneous determination of trace metals in human hair by dynamic ion-exchange chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 274 (1993) 163-170.
- [141] E. CLAYTON, K.K. WOOLLER, Sample preparation and system calibration for proton-induced X-ray emission analysis of hair from occupationally exposed workers. *Anal. Chem.*, 57 (1985) 1075-1079.
- [142] A. KHALIQUE, M. H. SHAH, M. JAFFAR, N. SHAHEEN, S.R. TARIQ, S. MANZOOR, Scalp hair metal analysis in the assessment of the occupational exposure of arc welders. *Toxicol. Environ. Chem.*, 88 (2006) 697-704.
- [143] B.J. STEVENS, Determination of aluminum, copper, and zinc in human hair. *At. Spectrosc.*, 4 (1983) 176-178.
- [144] A.S. RIBEIRO, A.J. CURTIUS, D. POZEBON, Determination of As, Cd, Ni and Pb in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide. *Microchem. J.*, 64 (2000) 105-110.
- [145] S. BOONEN, F. VANHAECKE, L. MOENS, R. DAMS, Direct determination of Se and As in solid certified reference materials using electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta*, 51B (1996) 271-278.
- [146] H.I. AFRIDI, T.G. KAZI, M.B. ARAIN, M.K. JAMALI, G.H. KAZI, N. JALBANI, determination of cadmium and lead in biological samples by three ultrasonic-based samples treatment procedures followed by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. AOAC Int.*, 90 (2007) 470-478.
- [147] P. BERMEJO-BARRERA, A. MOREDA-PIÑEIRO, J. MOREDA-PIÑEIRO, A. BERMEJO-BARRERA, Slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometric determination of lead, cadmium and manganese in human hair samples using rapid atomizer programs. *J. Anal. At. Spectrom.*, 12 (1997) 301-306.

- 
- [148] K.G. FERNÁNDEZ, A.R.A. NOGUEIRA, J.A. GOMES NETO, J. A. NÓBREGA, Determination of vanadium in human hair slurries by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 71 (2007) 1118-1123.
- [149] P. BERMEJO-BARRERA, A. MOREDA-PIÑEIRO, A. BERMEJO-BARRERA, Factorial designs for Cd, Cr, Hg, Pb and Se ultrasound-assisted acid leaching from human hair followed by atomic absorption spectrometric determination. *J. Anal. At. Spectrom.*, 15 (2000) 121-130.
- [150] P. BERMEJO-BARRERA, O. MUÑIZ-NAVEIRO, A. MOREDA-PIÑEIRO, A. BERMEJO-BARRERA, Experimental designs in the optimization of ultrasonic bath-acid-leaching procedures for the determination of trace elements in human hair samples by atomic absorption spectrometry.. *Forensic Sci. Int.*, 107 (2000) 105-120.
- [151] T.G. KAZI, H.I. AFRIDI, G.H. KAZI, M.K. JAMALI, M.B. ARAIN, N. JALBANI, Evaluation of essential and toxic metals by ultrasound-assisted acid leaching from scalp hair samples of children with macular degeneration patients. *Clin. Chim. Acta*, 369 (2006) 52-60.
- [152] B. HEINZOW, R. F. M. HERBER, J.M. CHRISTENSEN, R. CORNELIS, M. PAULSEN, E. SABBION, D. M. TEMPLETON, Y. THOMASSEN, M. VAHTER, O. VESTERBERG, Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine. *Pure & Appl. Chem.*, 67(1995) 1575-1608.
- [153] Y. HUANG, I.C. CHANG, C. PAN, C. HSIECH, T. SHI, T. LIN, Determination of chromium in whole blood and urine by graphite furnace AAS. *At. Spectrosc.*, 21(2000) 10-16.
- [154] N. TODOROVSKA, B. IZGI, T. STAFILOV, S. GUCER, D. MIHAJLOVIC, Determination of manganese in human serum and urine by electrothermal AAS. *Acta Pharm.*, 51 (2001) 201-209.
- [155] C. GONÇALVES MAGALHÃES, B. R. NUNES, M.B OSS GIACOMELLI, J.BENTO BORBA DA SILVA, Direct determination of bismuth in urine samples by electrothermal atomic absorption spectrometry: study of chemical modifiers. *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003) 787-789.
- [156] Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, MTA/MB-018/A94- Determinación de cromo en orina - Método de cámara de grafito/

Espectrofotometría de absorción atómica:

[http://www.mtas.es/insht/MTA/MB\\_018\\_A94.htm](http://www.mtas.es/insht/MTA/MB_018_A94.htm).

- [157] T. AYDEMIR, S. GUCER, Determination of nickel in urine by flame atomic absorption spectrometry after activated carbon enrichment. *Anal. Lett.*, 29 (1996) 351-367.
- [158] J.L. EDME, P. SHIRALI, M. MEREAU, A. SOBASZEK, C. BOULENGUEZ, F. DIEBOLD, J.M. HAGUENOER, Assessment of biological chromium among stainless steel and mild steel welders in relation to welding processes. *Int. Arch. Environ. Health*, 70 (1997) 237-242.
- [159] I.M.M. KENAWY, M.A.H. HAFEZ, M.A. AKL, R.R. LASHEIN, Determination by AAS of some trace heavy metal ions in some natural and biological samples after their preconcentration using newly chemically modified chloromethylated polystyrene-PAN ion-exchanger. *Anal. Sci.*, 16 (2000) 493-500.
- [160] C. HORN, J. TSAI, P. HORN, S. LIN, S. LIN, C. TZENG, Determination of urinary lead, cadmium and nickel in steel production workers. *Talanta*, 56 (2002) 1109-1115.
- [161] G.M. FARIAS, R.G. WUILLOUD, S. MOYANO, J.A. GASQUEZ, R.A. OLSINA, L.D. MARTINEZ, Determination of cobalt in urine by FI-ICP-AES with online preconcentration. *J. Anal. Toxicol.*, 26 (2002) 360-364.
- [162] I. NARIN, M. SOYLAK, Enrichment and determinations of nickel(II), cadmium(II), copper(II), cobalt(II) and lead(II) ions in natural waters, table salts, tea and urine samples as pyrrolydine dithiocarbamate chelates by membrane filtration-flame atomic absorption spectrometry combination. *Anal. Chim. Acta*, 493 (2003) 205-212.
- [163] M. SOYLAK, L. ELCL, I. NARIN, M. DOGAN, Application of solid-phase extraction for the preconcentration and separation of trace amounts of cobalt from urine. *Trace Elem. Electrolyt.*, 18 (2001) 26-29.
- [164] Y. SUNG, S. HUANG, On-line preconcentration system coupled to electrothermal atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of bismuth, cadmium, and lead in urine. *Anal. Chim. Acta*, 495 (2003) 165-176.
- [165] I. NARIN, M. SOYLAK, Enrichment and determinations of nickel(II), cadmium(II), copper(II), cobalt(II) and lead(II) ions in natural waters,

- table salts, tea and urine samples as pyrrolydine dithiocarbamate chelates by membrane filtration–flame atomic absorption spectrometry combination. *Anal. Chim. Acta*, 493 (2003) 205-212.
- [166] Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, MTA/MB-013/A87- Determinación de plomo en orina - Método de quelación-extracción/ Espectrofotometría de absorción atómica:  
[http://www.mtas.es/insht/MTA/MB\\_013\\_A87.htm](http://www.mtas.es/insht/MTA/MB_013_A87.htm).
- [167] J. WANG, P.D. SIEGEL, D. M. LEWIS, E. VO, W.E. WALLACE, K. ASHLEY, L.E. STETTLER, Spectroscopic techniques in industrial hygiene, en *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Ed. R. A. Meyers, John Wiley & Sons Ltd, Chichester (2000).
- [168] M. VALCÁRCEL, M.D. LUQUE DE CASTRO, *Flow-injection Analysis: Principles and Applications*, Ellis Horwood Ltd., Chichester (1987).
- [169] J. RUZICKA, E.H. HANSEN, *Flow Injection Analysis*, John Wiley & Sons, New York (1988).
- [170] Z. FANG, *Flow Injection Atomic Absorption Spectrometry*, John Wiley & Sons, Chichester (1995).
- [171] A. SANZ-MEDEL (ed.), *Flow Analysis with Atomic Spectrometric Detectors*, Elsevier, Amsterdam (1999).
- [172] D. CHEN, F. LAZARO, M.D. LUQUE DE CASTRO, M. VALCARCEL, Direct spectrophotometric determination of total boron in soils with ultrasonic leaching in automatic flow systems. *Anal. Chim. Acta*, 226 (1989) 221-227.
- [173] F. LÁZARO, M.D. LUQUE DE CASTRO, M. VALCÁRCEL, Direct introduction of solid samples into continuous-flow systems by use of ultrasonic irradiation. *Anal. Chim. Acta*, 242 (1991) 283-289.
- [174] J.L. LUQUE-GARCÍA, M.D. LUQUE DE CASTRO, Continuous ultrasound-assisted extraction of hexavalent chromium from soil with or without on-line preconcentration prior to photometric monitoring. *Analyst*, 127 (2002) 1115-1120.
- [175] A. MORENO-CID, M.C. YEBRA, Flow injection determination of copper in mussels by flame atomic absorption spectrometry after on-line continuous ultrasound-assisted extraction. *Spectrochim. Acta*, 57B

- (2002) 967-974.
- [176] M.C. YEBRA, A. MORENO-CID, Continuous ultrasound-assisted extraction of iron from mussel samples coupled to a flow injection-atomic spectrometric system. *J. Anal. At. Spectrom.*, 17 (2002) 1425-1428.
- [177] M.C. YEBRA, A. MORENO-CID, On-line determination of manganese in solid seafood samples by flame atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 477 (2003) 149-155.
- [178] M.C. YEBRA, A. MORENO-CID, R.M. CESPÓN, S. CANCELA, Flame AAS determination of total chromium in mussel samples using a continuous ultrasound-assisted extraction system connected to an on-line flow injection manifold. *At. Spectrosc.* 24 (2003) 31-36.
- [179] A. MORENO-CID, M.C. YEBRA, Continuous ultrasound-assisted extraction coupled to a flow-injection-flame atomic absorption spectrometric system for calcium determination in seafood samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, 379 (2004) 77-82.
- [180] M.C. YEBRA, S. CANCELA, A. MORENO-CID, Coupling continuous ultrasound-assisted extraction, preconcentration and flame atomic absorption spectrometric detection for the determination of cadmium and lead in mussel samples. *Anal. Chim. Acta*, 533 (2005) 51-56.
- [181] M.C. YEBRA, A. MORENO-CID, S. CANCELA, R.M. CESPÓN, Flow injection on-line ultrasound-assisted extraction of iron in meat samples coupled to a flame atomic absorption spectrometric system. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377 (2003) 730-734.
- [182] R.M. GARCÍA-REY, R. QUILES-ZAFRA, M.D. LUQUE DE CASTRO, New methods for acceleration of meat sample preparation prior to determination of the metal content by atomic absorption spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377 (2003) 316-321.
- [183] M.C. YEBRA, A. MORENO-CID, S. CANCELA, Fast on-line ultrasound-assisted extraction coupled to a flow injection-atomic absorption spectrometric system for zinc determination in meat samples. *Talanta*, 66 (2005) 691-695.
- [184] J. RUIZ-JIMÉNEZ, J.L. LUQUE-GARCÍA, M.D. LUQUE DE CASTRO, Dynamic ultrasound-assisted extraction of cadmium and lead from



- plants prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 480 (2003) 231-237.
- [185] S. CANCELA, M.C. YEBRA, Flow-injection flame atomic absorption spectrometric determination of trace amounts of cadmium in solid and semisolid milk products coupling a continuous ultrasound- assisted extraction system with the online preconcentration on a chelating aminomethylphosphoric acid resin. *J. AOAC Int.*, 89 (2006) 185-191.
- [186] M.C. YEBRA, S. CANCELA, A. MORENO-CID, Continuous ultrasound-assisted extraction of cadmium from vegetable samples with on-line preconcentration coupled to a flow injection-flame atomic spectrometric system. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 85 (2005) 305-313.
- [187] SciFinder Scholar: <http://www.cas.org/SCIFINDER/SCHOLAR/>
- [188] FIALab Instruments bibliography:  
[http://www.fialab.com/database1\\_interface/fia\\_database/results\\_page.asp](http://www.fialab.com/database1_interface/fia_database/results_page.asp)
- [189] The Flow Analysis Database at the University of North Florida:  
<http://www.fia.unf.edu/intro.php>
- [190] L. GIRARD, J. HUBERT, Speciation of chromium(VI) and total chromium determination in welding dust samples by flow-injection analysis coupled to atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 43 (1996) 1965-1974.
- [191] J. WANG, K. ASHLEY, E. R. KENNEDY, C. NEUMEISTER, Determination of hexavalent chromium in industrial hygiene samples using ultrasonic extraction and flow injection analysis. *Analyst*, 122 (1997) 1307-1312.
- [192] S. GAUTAM, B.C. BRADLEY, D.K. PURNENDU, Continuous automatic measurement of hexavalent chromium in airborne particulate matter. *Anal. Chem.*, 73 (2001) 2034-2040.
- [193] D. ZHENG, H. GE, On-line determination method and device for Cr(V) in the air of plating workshop. *Guangxi Huagong*, 31 (2002) 41-43.
- [194] P. HERNÁNDEZ, L. HERNÁNDEZ, J. VICENTE, M.T. SEVILLA, Use of an FIA ion exchanger-atomic absorption system for determining manganese, lead, and copper. *An. Quim.*, 81 (1985) 117-121.
- [195] Y. GAO, D. WANG, Y. LIN, J. LI, O. KONG, Determination of Pb and Cd in atmospheric particulates by flame atomic absorption spectrometry coupled with on-line flow injection pretreatment with ultrasonic

- leaching. *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, 23 (2003) 383-385.
- [196] J.L. BURGUERA, M. BURGUERA, C.E. RONDON, C. RIVAS, J.A. BURGUERA, O.M. ALARCON, Determination of lead in hair of exposed gas station workers and in unexposed adults by microwave-aided dissolution of samples and flow injection/atomic absorption spectrometry. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.*, 1 (1987) 21-26.
- [197] J.L. BURGUERA, M. BURGUERA, O.L. LA CRUZ, O.R. NARANJO, Determination of lead in the urine of exposed and unexposed adults by extraction and flow-injection/atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 186 (1986) 273-277.
- [198] BLANCO, M.; BOQUÉ, R.; CELA, R; COELLO, J. MASPOCH, S.; ORTIZ, M.C.; RIBA, J.; RUIS, F.X.; RUÍZ, A; SARABIA, L.A.; TOMÁS, Y.X. Avances en Quimiometría Práctica. Ed. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (1994).
- [199] S.N. DEMING, S.L. MORGAN, Experimental Design: A Chemometric Approach, Elsevier, Amsterdam (1993).
- [200] J.L. GOUPY, Methods for Experimental Design, Elsevier, Amsterdam (1993).
- [201] D.L. MASSART, B.G.M. VANDEGINSTE, L.M.C. BUYDENS, S. DE JONG, P.J. LEWI, J. SMEYERS-VERBEKE, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Elsevier, Amsterdam (1997).
- [202] W.P. GARDINER., G. GETTINBY, Experimental Design Techniques in Statistical Practice, Hordwood Publishing Ltd., Glasgow (1998).
- [203] R.L. PLACKETT, J.P. BURMAN, The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33 (1946) 305-25.
- [204] National Institute for Occupational Safety and Health- Department of Health and human Services. nomination of welding fumes for toxicity studies: [http://ntp-server.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/Chem\\_Background/ExSumPdf/Weldingfumes.pdf](http://ntp-server.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/Chem_Background/ExSumPdf/Weldingfumes.pdf).
- [205] H. PARLAR, H. GREIM, Essential Air Monitoring Methods for Occupational Health and Safety, Wiley-VCH, Weinheim (2006).
- [206] E.H. HANSEN, J. RUZICKA, F. J. KRUG, E. A. G. ZAGATTO, Selectivity in flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, 148 (1983) 111-125.

- 
- [207] J.N. MILLER, J.C. MILLER, Estadística y Quimiometría para Química Analítica, Prentice Hall, Madrid (2002).
- [208] Programa ULC (Calibración Lineal Univariante). Departamento de Química Analítica. Universidad de Tarragona.
- [209] E.W. FINUCANE, Definitions, Conversions and Calculations for Occupational Safety and Health Professionals, 3<sup>a</sup> Ed., CRC Press, Boca Ratón, Florida (2006).
- [210] G.L. OU-YANG, J.F. JEN, Simultaneous preconcentration of chromium(III) and chromium(VI) prior to speciation analysis. *Anal. Chim. Acta*, 279 (1993) 329-334.
- [211] E. MENENDEZ-ALONSO, S.J. HILL, M.E. FOULKES, J.S. CRIGHTON, Speciation and preconcentration of Cr[III] and Cr[VI] in waters by retention on ion exchange media and determination by EDXRF. *J. Anal. At. Spectrom.*, 14 (1999) 187-192.
- [212] S. YALÇIN, R. APAK, J. HIZAL, H. AFSAR, Recovery of copper (II) and chromium (III,VI) from electroplating-industry wastewater by ion exchange. *Sep. Sci. Technol.*, 36 (2001) 2181-2196.
- [213] M. C. YEBRA, M. F. ENRIQUEZ, A. GARCIA, A. MORENO-CID, Determination of trace amounts of lead in mussels by flow-injection flame atomic-absorption spectrometry coupled with on-line minicolumn preconcentration. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 370 (2001) 64-68.
- [214] M.C. YEBRA, J. SALGADO, L. PUIG, A. MORENO-CID, Field preconcentration of cadmium from seawater by using a minicolumn packed with Amberlite XAD-4/4-(2-pyridylazo) resorcinol and its flow-injection-flame atomic absorption spectrometric determination at the ng L<sup>-1</sup> Level. *Anal. Bioanal. Chem.*, 374 (2002) 530-534.
- [215] F.D. MARINO, D.J. INGLE, Determination of chromium(VI) in water by lophine chemiluminescence. *Anal. Chem.*, 53 (1981) 294-298.
- [216] M.A. MULOKOZI, Ion-exchange isolation of chromate from alkaline peroxide solutions. *Talanta*, 20 (1973) 1341-1344.
- [217] D.G. ELLINGSEN, L. DUBEIKOVSKAYA, K. DAHL, M. CHASHCHIN, V. CHASHCHIN, E. ZIBAREV, Y. THOMASSEN, Air exposure assessment and biological monitoring of manganese and other major welding fume components in welders. *J. Environ. Monit.*, 8 (2006) 1078-1086.

- 
- [218] F.H. CHANG, H.J. WANG, S.L. WANG, Y.C. WANG, D.P.H. HSIEH, L.W. CHANG, Y.C. KO, Survey of urinary nickel in residents of areas with a high density of electroplating factories. *Chemosphere* 65 (2006) 1723–1730.
- [219] A. DAVIS, C.P. CALLOWAY, B.T. JONES, Direct determination of cadmium in urine by tungsten-coil inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using palladium as a permanent modifier. *Talanta*, 71 (2007) 1144-1149.
- [220] P. WU, Y. ZHANG, Y. LV, X. HOU, Cloud point extraction–thermospray flame quartz furnace atomic absorption spectrometry for determination of ultratrace cadmium in water and urine. *Spectrochim. Acta*, 61B (2006) 1310-1314.
- [221] W. CHUACHUAD, J. TYSON, Determination of cadmium by flow injection atomic absorption spectrometry with cold vapor generation by a tetrahydroborate-form anion-exchanger. *J. Anal. At. Spectrom.*, 20 (2005) 273-281.
- [222] P. GRINBERG, R. CALIXTO DE CAMPOS, Iridium as permanent modifier in the determination of lead in whole blood and urine by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta*, 56B (2001) 1831-1843.
- [223] Y. ZHU, A. ITOH, E. FUJIMORI, T. UMEMURA, H. HARAGUCHI, Multielement Determination of Trace Metals in Seawater by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry after Tandem Preconcentration Using a Chelating Resin. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 78 (2005) 659-667.
- [224] Y. ZHU, A. ITOH, E. FUJIMORI, T. UMEMURA, H. HARAGUCHI, Determination of Rare Earth Elements in Seawater by ICP-MS after Preconcentration with a Chelating Resin-packed Minicolumn. *J. Alloys and Compounds*, 408-412 (2006) 985-988.
- [225] D. RAHMI, Y. ZHU, E. FUJIMORI, T. UMEMURA, H. HARAGUCHI, Multielement Determination of Trace Metals by ICP-MS with Aid of Down-sized Chelating Resin-Packed Minicolumn for Preconcentration. *Talanta*, 72 (2007) 600-606.

- 
- [226] A. PATRICIO, C. FERNÁNDEZ, A.M. MOTA, J.L. CAPELO, Dynamic versus static ultrasonic sample treatment for the solid-liquid pre-concentration of mercury from human urine. *Talanta*, 69 (2006) 769-775.
- [227] C.J. CASTRO MACIEL, G. MACHADO MIRANDA, D. PALMA DE OLIVEIRA, M.E.P.B. DE SIQUIERA, J.N. SILVEIRA, E.M. ÁLVAREZ LEITE, J.B. BORBA DA SILVA, Determination of cadmium in human urine by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 491 (2003) 231-237.
- [228] J.B. WILLIS, Determination of lead and other heavy metals in urine by atomic absorption spectroscopy. *Anal. Chem.*, 34 (1962) 614-617.
- [229] S.K. LISKA, J. KERKAY, K.H. PEARSON, Determination of zinc and copper in urine using Zeeman effect flame atomic absorption spectroscopy. *Clin. Chim. Acta*, 151 (1985) 231-236.
- [230] E.M. RODRÍGUEZ, G. GONZÁLEZ, C. DÍAZ, Some considerations about determination of Fe, Cu and Zn in urine by flame atomic absorption spectrometry. *Afinidad*, 474 (1998) 120-124.





# **Anexo I**

## **Índice de Tablas**





Nº Tabla	Leyenda	Página
I	Procesos de soldadura	8
II	Contaminantes presentes en todo tipo de soldadura	13
III	Contaminantes presentes en el ambiente según el tipo de revestimiento del electrodo	14
IV	Valores límites ambientales (VLAs) para los contaminantes presentes en soldadura	24
V	VLBs de metales en muestras de orina	51
VI	Intervalos de concentración para varios elementos en muestras de orina de personas no directamente expuestas a humos metálicos	52
VII	Intervalos de concentración para varios elementos en muestras de pelo de personas no directamente expuestas a humos metálicos	53
VIII	Composición de los materiales soldados	101
IX	Composición de los materiales de aportación	102
X	Situación de los puntos de muestreo de aire	103
XI	Variables y niveles considerados para el diseño factorial de screening	109
XII	Matriz del diseño de Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$ en el que se obtienen 13 experimentos para las seis variables implicadas	110
XIII	Concentraciones de los metales en distintos puntos de muestreo obtenidas por el método oficial	111
XIV	Matriz de diseño de Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$ para las seis variables con sus correspondientes valores del % eficacia en la extracción de cada experimento para la lixiviación del Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn	112-116
XV	Efectos estimados de cada una de las variables estudiadas	121
XVI	Condiciones establecidas para cada variable según el diseño de Plackett-Burman	136
XVII	Valores óptimos tomados para las variables no consideradas en el diseño factorial de superficie de respuesta para Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn	137
XVIII	Valores óptimos tomados para las variables no consideradas en el diseño factorial de superficie de respuesta para el Cr	138

Nº Tabla	Leyenda	Página
XIX	Valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta para Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn	138
XX	Valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta para el Cr	139
XXI	Matrices del diseño central composicional para Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn	141-145
XXII	Efectos estimados para las variables estudiadas	149
XXIII	Valores óptimos para las variables según cada diseño central composicional	150
XXIV	Valores óptimos para las variables implicadas en el proceso de extracción de los distintos metales del filtro de captación de aire	151
XXV	Dispersiones obtenidas utilizando diferentes caudales de portador y de nebulizador	153
XXVI	Condiciones de medida para cada metal en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer Modelo 5000	154
XXVII	Características de las disoluciones patrón de los distintos metales utilizadas para trazar la recta de calibrado	159
XXVIII	Límites de detección para la determinación de metales en humos de soldadura	164
XXIX	Límites de cuantificación para la determinación de metales en humos de soldadura	165
XXX	Sensibilidad en la determinación de metales en humos de soldadura	167
XXXI	Intervalos lineales en la determinación de metales en humos de soldadura	168
XXXII	Estudio de la precisión en la determinación de metales en humos de soldadura	170
XXXIII	Concentraciones de los metales distintos puntos de muestreo obtenidas por el método oficial	171
XXXIV	Concentraciones de los metales distintos puntos de muestreo obtenidas por el método propuesto	171
XXXV	Determinación de metales en humos de soldadura: test de parejas	172
XXXVI	Características de las disoluciones lixiviantes utilizadas para el estudio de la recuperación analítica	173
XXXVII	Condiciones de medida de las muestras para el estudio de la recuperación analítica	174

Nº Tabla	Leyenda	Página
XXXVIII	Resultados del cálculo de la recuperación analítica	175
XXXIX	Características de las rectas de adición de los distintos metales	176
XL	Frecuencia de muestreo para la determinación de metales en humos de soldadura	178
XLI	Concentración de cadmio en humos de soldadura	179-183
XLII	Cálculo de la dosis máxima permisible (%DMP) para cada metal	185
XLIII	Preconcentración de Cr(VI): variables y niveles considerados para el diseño factorial de screening	192
XLIV	Matriz del diseño fracción $1/2 \cdot 2^{4-1}$ en el que se obtienen 9 experimentos para las cuatro variables implicadas	193
XLV	Matriz del diseño fracción $1/2 \cdot 2^{4-1}$ para las cuatro variables implicadas con sus correspondientes valores del % recuperación de cada experimento	194
XLVI	Efectos estimados de cada una de las variables estudiadas	195
XLVII	Condiciones establecidas para cada variable según el diseño de screening (diseño fracción $1/2$ )	197
XLVIII	Valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta	198
XLIX	Matriz del diseño central composicional $2^2 +$ estrella con sus correspondientes valores del % recuperación de cada experimento para la preconcentración del Cr(VI). B, caudal de muestreo; D, volumen de eluyente	199
L	Valores óptimos para las variables implicadas en el proceso de preconcentración continua del Cr(VI)	201
LI	Variables y niveles considerados para el diseño factorial de screening para el proceso de extracción del Cr(VI)	204
LII	Matriz del diseño fracción $1/2 \cdot 2^{4-1}$ en el que se obtienen 9 experimentos para las cuatro variables implicadas en la extracción de Cr(VI)	205
LIII	Matriz del diseño fracción $1/2 \cdot 2^{4-1}$ en el que se obtienen 9 experimentos para las cuatro variables implicadas en la extracción de Cr(VI) con sus correspondientes valores del % eficacia en la extracción de cada experimento	206
LIV	Efectos estimados de cada una de las variables estudiadas	207

Nº Tabla	Leyenda	Página
LV	Condiciones establecidas para cada variable según el diseño de screening (diseño fracción 1/2)	210
LVI	Valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta	211
LVII	Matriz del diseño central composicional $2^2 +$ estrella con sus correspondientes valores del % eficacia en la extracción de cada experimento para la lixiviación del Cr(VI)	212
LVIII	Valores óptimos para las variables implicadas en el proceso de lixiviación del Cr(vi) contenido en el filtro de captación de aire en el sistema FIA	214
LIX	% Recuperación obtenidos para el Cr(VI) en presencia de Cr (III)	215
LX	Límites de detección y cuantificación para la determinación de Cr(VI) en humos de soldadura	219
LXI	Sensibilidad e intervalo lineal en la determinación de Cr(VI) en humos de soldadura	220
LXII	Estudio de la precisión en la determinación de Cr(VI) en humos de soldadura	221
LXIII	Concentración de Cr(VI) en humos de soldadura	225
LXIV	Variables y niveles considerados para el diseño factorial de screening	231
LXV	Concentración de los metales en una muestra de pelo obtenidas por el método de referencia	233
LXVI	Matriz de diseño de Plackett-Burman $2^{7*3}/32$ para las siete variables con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación de los metales de muestra de pelo	234-238
LXVII	Efectos estimados de cada una de las variables estudiadas	238
LXVIII	Condiciones establecidas para cada variable según el diseño de Plackett-Burman	257
LXIX	Valores óptimos tomados para las variables no consideradas en el diseño factorial de superficie de respuesta para Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn	259
LXX	Valores óptimos tomados para las variables no consideradas en el diseño factorial de superficie de respuesta para el Cr	260
LXXI	Valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta para Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn	260

Nº Tabla	Leyenda	Página
LXXII	Valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta para el Cr	260
LXXIII	Matriz del diseño central composicional $2^2$ + estrella con sus correspondientes valores del % Eficacia en la Extracción de cada experimento para la lixiviación de los metales	262-266
LXXIV	Efectos estimados para las variables estudiadas	270
LXXV	Valores óptimos para las variables según cada diseño central composicional	271
LXXVI	Valores óptimos para las variables implicadas en el proceso de extracción de los distintos metales de la muestra de pelo	273
LXXVII	LOD y LOQ para la determinación de metales en muestras de pelo	280
LXXVIII	Sensibilidad en la determinación de metales en muestras de pelo	281
LXXIX	Intervalos lineales en la determinación de metales en muestras de pelo	282
LXXX	Estudio de la precisión en la determinación de metales en muestras de pelo	284
LXXXI	Determinación de metales en muestras de pelo: test de parejas	285
LXXXII	Características de las disoluciones lixiviantes utilizadas para el estudio de la recuperación analítica	286
LXXXIII	Resultados del cálculo de la recuperación analítica	287
LXXXIV	Resultados de la medida de los materiales de referencia	288
LXXXV	Características de las rectas de adición de los distintos metales	289
LXXXVI	Frecuencia de muestreo para la determinación de metales en muestras de pelo	291
LXXXVII	Concentración de los metales en muestras de pelo de trabajadores expuestos a humos de soldadura	292-296
LXXXVIII	Concentración de los metales en muestras de pelo control	297-301
LXXXIX	Preconcentración de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni y Pb: Variables y niveles considerados para el diseño factorial de screening	311

Nº Tabla	Leyenda	Página
XC	Matriz de diseño de Plackett-Burman $2^{7*3/32}$ para las siete variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la preconcentración de los metales	313-316
XCI	Efectos estimados de cada una de las variables estudiadas	321
XCII	Condiciones establecidas para cada variable según el diseño de Plackett-Burman	335
XCIII	Valores óptimos tomados para las variables no consideradas en el diseño factorial de superficie de respuesta para la preconcentración de los metales en la resina	337
XCIV	Valores máximos y mínimos correspondientes a cada variable en el diseño factorial de superficie de respuesta para la preconcentración de los metales en la resina	337
XCV	Matriz del diseño central composicional $2^4$ + estrella con sus correspondientes valores del % Recuperación de cada experimento para la preconcentración de los metales	339-346
XCVI	Efectos estimados para las variables estudiadas	356
XCVII	Valores óptimos para las variables según cada diseño central composicional	357
XCVIII	Valores óptimos de todas las variables implicadas en la preconcentración de los metales en la resina quelatante Chelite Che	358
XCIX	Variables y niveles considerados para el diseño factorial de superficie de respuesta central composicional $2^3$ + estrella	362
C	Concentración de los metales en una muestra de orina obtenidas por el método de referencia	363
CI	Matriz del diseño central composicional $2^3$ + estrella para las tres variables con sus correspondientes valores de % Recuperación de cada experimento para la determinación de los metales en orina	364-367
CII	Valores óptimos para las variables implicadas en la digestión en línea de la muestra de orina	373
CIII	Características de las disoluciones patrón de los distintos metales utilizadas para trazar la recta de calibrado	377
CIV	Factores de preconcentración obtenidos para los metales utilizando el sistema FIA propuesto	380
CV	LOD y LOQ para la determinación de metales en muestras de orina	381

Nº Tabla	Leyenda	Página
CVI	Sensibilidad en la determinación de metales en muestras de orina	381
CVII	Intervalos lineales en la determinación de metales en muestras de orina	382
CVIII	Estudio de la precisión en la determinación de metales en muestras de orina	383
CIX	Determinación de metales en muestras de orina: test de parejas	384
CX	Resultados del cálculo de la recuperación analítica	386
CXI	Características de las rectas de adición de los distintos metales	387
CXII	Frecuencia de muestreo para la determinación de metales en muestras de orina	389
CXIII	Concentración de metales en muestras de orina de trabajadores expuestos a humos de soldadura	391
CXIV	Concentración de metales en muestras de orina control	392
CXV	Estudio de la precisión en la determinación de cinc en muestras de orina	401
CXVI	Determinación de cinc en muestras de orina: test de parejas	401
CXVII	Concentración de Zn en muestras de orina de trabajadores expuestos a humos de soldadura	404
CXVIII	Concentración de Zn en muestras de orina control	405







## **Anexo II**

### **Índice de Figuras**



Nº Figura	Leyenda	Página
1	Procedimientos de soldadura	7
2	Soldadura al arco con electrodo de grafito	10
3	Soldadura al arco con electrodo metálico	10
4	Soldadura por arco sumergido	11
5	Soldaduras al arco con gas protector	11
6	Puesto de soldadura fijo	19
7	Puesto de soldadura móvil	19
8	Ventilación general	20
9	Extracción incorporada a la pistola de soldadura	20
10	Extracción incorporada en la pantalla de protección	20
11	Protección individual del soldador	21
12	Forma de actuar para determinar el riesgo higiénico por soldadura	22
13	Partes de un filtro	57
14	Bomba de muestreo	58
15	Zona de toma de muestra de pelo	62
16	Recipiente para la toma de muestra de orina	66
17	Componentes básicos de un sistema FIA	71
18	Acoplamiento FIA-FAAS	73
19	Sistema FIA de extracción en línea utilizando energía de ultrasonidos para reacciones de cinética rápida	76
20	Sistema FIA de extracción en línea utilizando energía de ultrasonidos para reacciones de cinética lenta	76
21	Proporción entre los métodos FIA propuestos para la determinación de metales en muestras higiénicas	79
22	Comparación entre los métodos FIA propuestos para la determinación de metales en pelo de personas expuestas y no expuestas	79
23	Comparación entre los métodos FIA propuestos para la determinación de metales en orina de personas expuestas y no expuestas	80
24	Métodos FIA propuestos para la determinación de metales en muestras de aire del medio ambiente laboral	81
25	Puntos de muestreo en el taller de soldadura	102

Nº Figura	Leyenda	Página
26	Sistema FIA usado para la determinación de metales en los filtros de captación de aire	105
27	Fotografía del sistema FIA utilizado, donde se puede observar el acoplamiento con la Espectroscopia de Absorción Atómica	105
28	Fotografía de la columna en la que se introduce el filtro en el sistema FIA	106
29	Cartas Pareto estandarizadas de los efectos principales en el diseño factorial de screening	117-121
30	Representación de los efectos Principales de las seis variables que afectan al proceso de extracción.	122-123
31	Cartas Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos	128-130
32	Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de Cd, Co, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn	131-135
33	Cartas Pareto estandarizadas de los efectos principales en el diseño factorial	146
34	Superficies de respuesta para el modelo	147-148
35	Proceso de lixiviación continua y medida de la disolución blanco	156
36	Determinación de los metales en el lixiviado	157
37	Medida de las disoluciones patrón de los distintos metales	158
38	Calibrados directos y calibrados FIA	160-162
39	Rectas de adición	176-177
40	Concentración de metales en humos de soldadura	184
41	Diseño de la minicolumna conteniendo la resina Dowex 1-X8	190
42	Dispositivo FIA de preconcentración.	191
43	Preconcentración de Cr(VI). Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening	194
44	Representación de los efectos principales de las cuatro variables que afectan al proceso de preconcentración de Cr(VI)	195
45	Carta Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos	196
46	Superficie de respuesta proporcionadas por el diseño de screening (Diseño Fracción 1/2)	197

Nº Figura	Leyenda	Página
47	Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial	200
48	Superficie de respuesta para el modelo	200
49	Sistema FIA usado para la determinación de Cr(VI) en los filtros de captación de aire	202
50	Lixiviación alcalina del Cr(VI). Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening	206
51	Lixiviación alcalina del Cr(VI). Representación de los efectos principales de las cuatro variables que afectan al proceso de extracción	207
52	Lixiviación del Cr(VI). Carta Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos	209
53	Superficie de respuesta proporcionadas por el diseño de screening (Diseño Fracción 1/2)	209
54	Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial	213
55	Superficie de respuesta para el modelo	213
56	Sistema FIA usado para la determinación de Cr(VI) en los filtros de captación de aire. Etapa de lixiviación continua	216
57	Sistema FIA usado para la determinación de Cr(VI) en los filtros de captación de aire. Etapa de preconcentración-elución continua	217
58	A: Calibrado directo para el Cr(VI). B: Calibrado FIA para el Cr(VI)	218
59	Cr(VI): Recta de adición	224
60	Concentración de cromo en humos de soldadura. A: puesto de trabajo 1; B: puesto de trabajo 2	226
61	Fotografía de la columna donde se introduce la muestra de pelo en el sistema FIA	230
62	Lixiviación de los metales. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening	239-243
63	Lixiviación de los metales. Representación de los efectos principales de las siete variables que afectan al proceso de extracción.	244-245
64	Lixiviación de los metales Carta Pareto después de descartar los efectos estadísticamente no significativos	250-251
65	Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman en la determinación de los metales en pelo	252-257

Nº Figura	Leyenda	Página
66	Determinación de metales en pelo. Cartas Pareto estandarizadas de los efectos principales en el diseño factorial	267-268
67	Superficies de respuesta para el modelo	269-270
68	Proceso de lixiviación continua y medida de la disolución blanco	276
69	Determinación de los Metales en el Lixiviado	277
70	Medida de las Disoluciones Patrón de los Distintos Metales	278
71	Rectas de adición	289-291
72	Resultados concentración de metales en pelo	302-304
73	Diseño de la minicolumna conteniendo la resina Chelite Che	309
74	Dispositivo FIA de preconcentración de la muestra de orina	310
75	Preconcentración de los metales. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial de screening	317-320
76	Preconcentración de los metales. Representación de los efectos principales de las siete variables que afectan al proceso de preconcentración	322-323
77	Cartas Pareto después de descartar las variables que no parecían tener influencia sobre el proceso de preconcentración en el intervalo estudiado	325
78	Gráficos de respuesta para el modelo en forma de cubo proporcionados por el diseño de Plackett-Burman en la preconcentración de los metales	327-334
79	Preconcentración de los metales. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial	347-351
80	Preconcentración de los metales. Gráfico de respuesta para el modelo en forma de cubo	352-355
81	Sistema FIA usado para la determinación metales en muestras de orina	359
82	Módulo de digestión	360
83	Módulo de digestión bajo la acción de la energía de ultrasonidos	360
84	Determinación de metales en orina. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales en el diseño factorial	368-370

Nº Figura	Leyenda	Página
85	Gráficos de respuesta para el modelo en forma de cubo proporcionados por el diseño factorial	371-372
86	Sistema FIA usado para la determinación de cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel y plomo en orina	375
87	Calibrado FIA para la preconcentración de metales en orina	378-380
88	Rectas de adición	387-388
89	Resultados concentración de metales en orina	393-395
90	Sistema FIA usado para la determinación de cinc en orina	396
91	Sistema FIA optimizado usado para la determinación de cinc en orina	398
92	Calibrado FIA para la determinación de cinc	399
93	Recta de adición para el Zn	403
94	Resultados Zn en orina	405







**Anexo III**

**Producción Científica Fruto  
de esta Memoria**



## ARTÍCULOS EN REVISTAS

- ✓ Determination of Trace Amounts of Zinc in Welding Fumes by Flow-Injection Flame Atomic Absorption Spectrometry

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*Spectroscopy Letters* (2006) 39: 727–735

- ✓ Fast Ultrasound-assisted Extraction of Copper, Iron, Manganese and Zinc from Human Hair Samples Prior to Flow Injection Flame Atomic Absorption Spectrometric Detection

M. C. Yebra-Biurrun, R. M. Cespón-Romero

*Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2007) 388:711–716

- ✓ Flow Injection Determination of Lead and Cadmium in Hair Samples from Workers Exposed to Welding Fumes

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*Analytica Chimica Acta* (2007) 600: 221–225

- ✓ Application of factorial designs for optimisation of on-line cadmium, lead and nickel determination in welding fumes by atomic absorption spectrometry

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*International Journal of Environmental Analytical Chemistry* (aceptado)

- ✓ Application of a Fast Automatic Methodology for Determination of Copper, Iron and Manganese in Welding Fumes

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*Journal of Occupational and Environmental Hygiene* (enviado)

## ARTÍCULOS EN REVISTAS

- ✓ Determination of trace metals in urine with an on-line ultrasound-assisted digestion system combined with a flow-injection preconcentration system coupled to flame atomic absorption spectrometry

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*Analytica Chimica Acta* (enviado)

- ✓ Determination of hexavalent chromium in welding fumes by flow injection flame atomic absorption spectrometry after dynamic alkaline ultrasound-assisted extraction/anion exchange preconcentration

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*Atomic Spectroscopy* (enviado)

- ✓ Flow injection determination of total chromium in urine of occupationally exposed workers

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*Microchimica Acta* (aceptado)

- ✓ Ultrasound-assisted digestion using a flow-injection/stopped-flow manifold for urinary nickel determination by flame atomic absorption spectrometry

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*Talanta* (enviado)

### COMUNICACIONES A CONGRESOS

- ✓ 3rd International Conference on Occupational Risk Prevention  
Santiago de Compostela, 2-4/6/2004

- Póster titulado: Automatic Determination of Nickel in Workplace Air by Atomic Absorption Spectrometry  
R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

Publicación: Proceedings of 3rd International Conference on Occupational Risk Prevention. Edited by P.R. Mondelo, M. Mattila, W. Karwowski and A. Hale. ISBN: 84-933328-2-8.

- ✓ 10th International Conference on Flow Analysis  
Porto (Portugal), 3-8/9/2006

- Póster titulado: Flow injection determination of hexavalent chromium in workplace air by atomic absorption spectrometry  
M. C. Yebra-Biurrun, R. M. Cespón-Romero
- Póster titulado: Flow injection determination of lead and cadmium in hair samples from workers exposed to welding fumes  
R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

## COMUNICACIONES A CONGRESOS

- ✓ Third International Symposium FESTEM (Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals)  
Santiago de Compostela, 16-19/5/2007

- Póster titulado: Fast flow injection flame atomic absorption determination of urinary nickel in workers exposed to welding fumes

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

Publicación: *Química Clínica* (2007) 26 (S1): S30

- Póster titulado: Dynamic ultrasound assisted extraction of manganese from hair samples from workers exposed to welding fumes

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

Publicación: *Química Clínica* (2007) 26 (S1): S31

- ✓ 6 th International Conference on Occupational Risk Prevention  
La Coruña, 14-16/5/2008

- Póster titulado: Flow injection on-line dilution for zinc determination in urine with flame atomic absorption spectrometry detection (enviado resumen)

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

Artículo I

**DETERMINATION OF TRACE AMOUNTS OF ZINC IN WELDING  
FUMES BY FLOW-INJECTION FLAME ATOMIC ABSORPTION  
SPECTROMETRY**

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*Spectroscopy Letters* (2006) **39**: 727–735







*Spectroscopy Letters*, 39: 727–735, 2006  
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC  
ISSN 0038-7010 print/1532-2289 online  
DOI: 10.1080/00387010600934758



## Determination of Trace Amounts of Zinc in Welding Fumes by Flow-Injection Flame Atomic Absorption Spectrometry

**R. M. Cespón-Romero and M. C. Yebra-Biurrun**

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology,  
Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela,  
Santiago de Compostela, Spain

**Abstract:** A flow-injection flame atomic absorption spectrometric method for the determination of zinc in welding fumes has been developed. The method is based on the continuous ultrasound-assisted dissolution of the zinc oxide collected on the air filter. Variables such as sonication time, nature and concentration of the acid solution used as dissolving solution, dissolution temperature, flow rate of the continuous manifold, and dissolving solution volume were simultaneously studied by applying a Plackett–Burman design. Results showed that only the concentration of nitric acid solution used as dissolving solution was a statistically significant variable (confidence interval of 95%). Factors such as dissolution temperature and sonication time were finally optimized by using a central composite design. The detection limit was  $1.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  and the repeatability of the overall method is 1.6% ( $n = 11$ ) for a zinc concentration of  $75.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . The proposed method was applied to the determination of zinc in welders' workplace environments.

**Keywords:** Flame atomic absorption spectrometry, flow injection, welding fumes, zinc

Received 25 March 2006, Accepted 31 July 2006

The authors were invited to contribute this paper to a special issue of the journal entitled "Spectroscopy and Automation". This special issue was organized by Miguel de la Guardia, Professor of Analytical Chemistry at Valencia University, Spain.

Address correspondence to M. C. Yebra-Biurrun, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela, Spain. Fax: 34981595012; E-mail: qncayebi@usc.es

## INTRODUCTION

Zinc may be present as a surface coating on steel products, that is, galvanized steel. The Zn fumes given off during welding of Zn-coated steels consist of zinc oxide.<sup>[1]</sup> Exposure and inhalation of these fumes causes metal fume fever, a flu-like syndrome common among welders, characterized by acute or subacute symptoms of respiratory tract inflammation, myalgias, and fever.<sup>[2,3]</sup> These health hazards require not only worker protection but also the need of a regular monitoring of zinc levels in the workplace. Thus, zinc proceeding from welding fumes has been determined by X-ray photoelectron spectroscopy,<sup>[4]</sup> neutron activation analysis,<sup>[5]</sup> or X-ray fluorescence spectrometry,<sup>[6,7]</sup> but atomic absorption spectrometry (AAS) and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) have been the analytical techniques more employed for metal determination in welding fumes.<sup>[8–13]</sup> In fact, the Occupational Safety & Health Administration (OSHA) ID-121, ID-206, and ID-125G methods,<sup>[14]</sup> National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) 7300, 7301, and 7303 methods,<sup>[15]</sup> and National Institute of Security and Hygiene in the Work (INSHT) MTA/MA-025/A92 method<sup>[16]</sup> for metal and metalloid particulates in workplace atmospheres and metalloid particulates from solder operations are based on AAS or ICP-AES detection.

Sample preparation for analysis of metals in industrial hygiene samples typically involves filter digestion with concentrated mineral acids. However, the use of concentrated nitric or perchloric acid presents several drawbacks including safety precautions. Nowadays, sample dissolution procedures assisted by ultrasonic radiation are an inexpensive, fast, and efficient alternative to traditional sample preparation methods.<sup>[17–19]</sup> Therefore, intensive treatments with concentrated acids involving filter decomposition can be avoided. Thus, ultrasonic-assisted extraction has been proved as an effective method for discontinuous quantitative extraction of a number of metals from workplace air samples and other analytes in a wide variety of samples.<sup>[20,21]</sup> Nevertheless, for the determination of metals in air, there are no cases in the literature in which ultrasound energy has been used in a continuous mode coupled to a flow injection system, so for these determinations a complete automatization of the analytical process has not been obtained.

The purpose of the current paper was to develop a fast, simple, and inexpensive method for routine determination of zinc in welding fumes. Flame atomic absorption spectrometry (FAAS) has been considered as an appropriate technique for that purpose, because it is fast, easy to use, sufficiently sensitive to accurately detect trace Zn concentrations, and available in most analytical laboratories. Continuous ultrasound-assisted dissolution of the zinc oxide collected on the air filter is proposed instead of filter digestion, because of the time required, cost, and risks involved in the latter procedure.

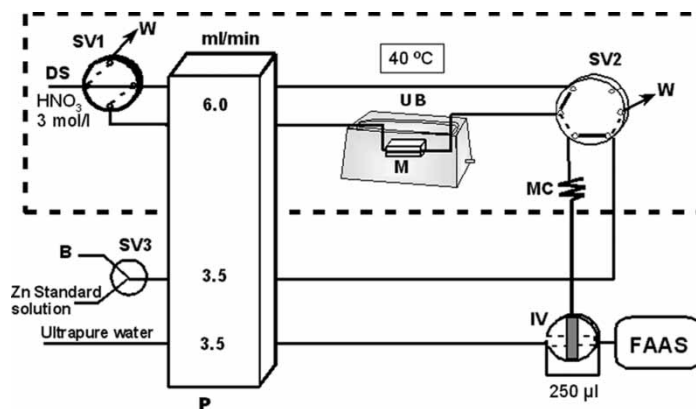
## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

Ultrapure water of 18.2 M $\Omega$ cm resistivity, obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used for the preparation of the reagents and standards. Hydrochloric acid, nitric acid (Merck, Darmstadt, Germany) and 1000  $\mu$ g/mL zinc standard (Merck) were analytical reagent grade.

### Apparatus

A Perkin Elmer Model 5000 atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) fitted with a zinc hollow cathode lamp was used. The instrument was set at 213.9 nm. Signals were measured as peak height. The spectrometer output was connected to a Perkin Elmer model 50 servograph recorder with a range of 5 mV. The flow injection system (Fig. 1) comprises a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump (Gilson, Villiers Le Bel, France) fitted with Viton tubes, an ultrasonic bath (Selecta, Barcelona, Spain), four Rheodyne injection or switching valves (Rohnert Park, USA), models 5041 and 5301, and a glass minicolumn (100 mm  $\times$  3 mm i.d., bed volume 700  $\mu$ L) (Omnifit, Cambridge, UK). The ends of minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541).



**Figure 1.** Experimental setup and optimum working conditions for the continuous determination of zinc in welding fumes. DS, dissolving solution; P, peristaltic pump; UB, ultrasonic bath; M, minicolumn containing the filter; IV, injection valve; SV, switching valves; MC, mixing coil; W, waste; B, blank; FAAS, flame atomic absorption spectrometer.

Workplace air samples were pumped with a Gilian HFS-513 air-sampling pump with constant high flow of 750 to 5000 mL/min (Sensidyne, West Cladwell, USA). Welding fumes were collected on Millipore mixed cellulose ester filters (0.8- $\mu$ m pore size). Each filter is in a polystyrene cassette of 37-mm diameter furnished with a cellulose support.

Statistical analysis of the experimental designs was carried out by means of the Statgraphics Plus V.5.1 statistical package (Manugistic, Inc., Rockville, MD, USA).

### Evaluation of the Homogeneity of the Samples

Before starting the optimization study of the continuous dissolution process, the homogeneity of the samples was tested. For this, at the same time were sampled six filters with six air-sampling pumps in a stationary sampling site at the workplace environment placed 0.5 m away from the breathing zone of the welder (in order to not disturb him). The objective was that between sampling filters, variation could not mask the effects of experimental factors to be optimized. With this aim, a set of six filter samples was collected during an effective welding time of 15 min at a sampling flow rate of 1.5 L/min. Zinc oxide particles captured on the cellulose ester filters were analyzed using INSHT MTA/MA-025/A92 method.<sup>[16]</sup>

### Procedure for Zinc Determination in Welding Fumes

The overall arrangement for zinc determination in welding fumes is illustrated in Fig. 1. Each filter was placed into a glass minicolumn (dissolution cell). These dissolution cells were assembled sequentially to the flow system. Once assembled, the dissolution cell was immersed within the ultrasonic bath. Then, by means of a switching valve (SV1), the dissolution circuit was filled with 5 mL of the acid solution (3 mol/L nitric acid). Upon loading the dissolution circuit, SV1 was switched to its other position. Thus, the continuous dissolution system, including the dissolution cell and the peristaltic pump, became a closed circuit. With the aim to dissolve zinc oxide, the acid solution circulated through the dissolution cell at 6 mL/min under ultrasonic irradiation during 4 min. In order to avoid compactness of the filter into the minicolumn and cause overpressure in the flow system during the dissolution step, the direction of the nitric acid flow was changed every 40 s. After the dissolution step, SV2 was switched to its other position, and the dissolved zinc oxide was circulated through the mixing coil where the solution was homogenized. Then, the loop of the injection valve (IV) was filled with a total volume of 250  $\mu$ L of zinc solution, which was injected into an ultrapure water carrier stream that transported it at 3.5 mL/min to the detector.

Standard solutions containing up to 1.0 µg/mL of zinc in the same acid medium as the dissolving solution (3 mol/L nitric acid) were introduced into the flow system as is shown in Fig. 1.

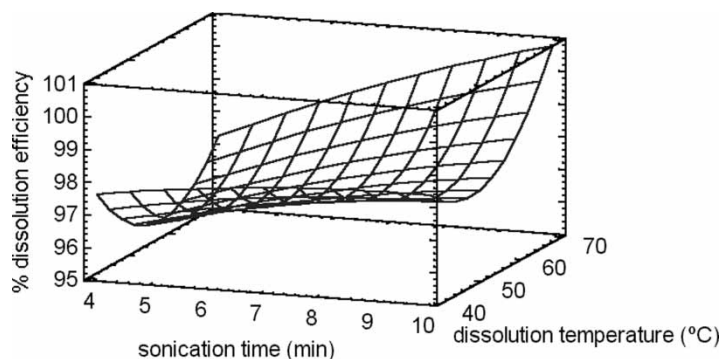
## RESULTS AND DISCUSSION

A multivariate optimization design was applied to study the continuous dissolution step. The variables simultaneously optimized were sonication time, nature and concentration of the acid solution used as dissolving solution (nitric and hydrochloric acid concentrations), dissolution temperature, flow rate of the continuous manifold, and dissolving solution volume. A Plackett–Burman  $2^6$  type III resolution design allowing 6 degrees of freedom involved 12 nonrandomized runs plus one center point was selected for screening study of the behavior of the main factors affecting the continuous dissolution process. The upper and lower values studied for each variable are shown in Table 1. The variable response (% dissolution efficiency) was calculated according to the following equation: % dissolution efficiency =  $(A/B) \times 100$ , where  $A$  is the Zn concentration obtained with the continuous dissolution procedure and  $B$  the Zn concentration obtained with the INSHT MTA/MA-025/A92 method.<sup>[16]</sup> The mean concentration of Zn obtained by the INSHT MTA/MA-025/A92 method was 74.7 µg/m<sup>3</sup> and the relative standard deviation was 2.1%, which is an acceptable value to consider homogeneous the samples obtained with different pumps at the same time. The conclusions of the screening study were that sonication time, dissolution temperature, flow rate of the continuous manifold, dissolving solution volume, and hydrochloric acid concentration

**Table 1.** Ranges over which the variables were studied and their optimum values

Variable	Low	Upper	Optimum
Plackett–Burman $2^6$ type III resolution design			
Nitric acid concentration (mol/L)	0	3	3
Hydrochloric acid concentration (mol/L)	0	3	0
Sonication time (min)	0.5	5	—
Dissolution temperature (°C)	20	70	—
Flow rate of the continuous manifold (mL/min)	3	6	6
Dissolving solution volume (mL)	2	5	5
$2^2$ + Star orthogonal central composite design			
Sonication time (min)	4	10	4
Dissolution temperature (°C)	40	70	40

were variables not statistically influential at the 95% confidence level in the ranges studied. Nevertheless, the results showed better % dissolution efficiency with the high value tested for these variables. Though hydrochloric acid concentration has a positive influence, a run of the experimental design achieved a 96.2% dissolution efficiency with the minimum value for this variable (0 mol/L). Thus, this minimum value and high values tested for flow rate of the continuous manifold (6 mL/min) and dissolving solution volume (5 mL) were selected for subsequent experiments. On the other hand, the nitric acid concentration was a factor statistically influential at the 95% confidence level for the dissolution of the target analyte. However, nitric acid concentration was fixed to 3 mol/L because higher acid concentrations can produce serious damage in the spectrometer nebulizer of FAAS, and using this concentration in one of the runs of the Plackett–Burman design a quantitative % dissolution efficiency was achieved (96.2%). Because the Plackett–Burman design only provides the tendencies to the optimum, a new factorial design was performed in order to fine tune the sonication time and dissolution temperature to obtain a quantitative % dissolution efficiency with the minimum values of these variables. For this, we used an orthogonal central composite design,  $2 \wedge 2 + \text{star}$  with two center points, resulting in 10 nonrandomized runs with 4 error degrees of freedom. Axial distance ( $\alpha$ ) was selected having a value of 1.07809 in order to establish the orthogonality condition. These experiments were performed keeping all the other factors at optimum values (according to factorial screening design): nitric concentration 3 mol/L, hydrochloric acid concentration 0 mol/L, dissolving solution volume 5 mL, and flow rate of the continuous manifold 6.0 mL/min. The results obtained confirmed that the dissolution temperature and the sonication time were not statistically influential at the 95% confidence level in the ranges studied (40–70°C and 4–10 min, for dissolution temperature and the sonication time, respectively). Figure 2



**Figure 2.** Estimated response surface from the  $2 \wedge 2 + \text{star}$  orthogonal central composite design.

shows the response surface for this design, which appeared with quantitative % dissolution efficiencies in all the ranges studied for the two variables tested ( $>95\%$ ). Given these findings, in order to increase the sampling frequency, we decided to work with the optimum operational conditions given in Table 1 under the optimum values heading.

Other flow parameters involving zinc determination were also optimized. Thus, it was verified that with a mixing coil length of 500 cm (0.8 mm i.d.), a total homogenization of the acid solution was obtained. Nevertheless, longer lengths would increase the analysis time too much, diminishing the sampling frequency. The carrier flow rate and the injected volume were also studied. The carrier flow rate was studied between 3 and 6 mL/min and the injected volume of the acid solution between 100 and 400  $\mu\text{L}$ . The aspiration flow rate of the nebulizer was adjusted to be the same as the flow rate of the carrier solution. Although the highest aspiration flow rate provides the best sensitivity, at the same time a high dispersion takes place because the carrier flow rate has increased. Therefore, a carrier flow rate of 3.5 mL/min (dispersion equal to 1.1) was chosen as a compromise to obtain the minimum dispersion in the flow system. With regard to the injected volume, it was verified that, as it is logical, when the volume was increased, the sensitivity was increased. Therefore, a volume of 250  $\mu\text{L}$  was chosen, which in addition allows one to inject several times the acid solution, verifying its homogeneity.

In order to test the influence of ultrasound energy on dissolution efficiency, an experiment was developed in absence of ultrasonic radiation. In these conditions, results obtained demonstrated that dissolution efficiency was reduced about 20%.

### Analytical Figures of Merit

The calibration graph of the method was run ( $n = 7$ ) under the optimal chemical and flow conditions for the global process. The equation was:  $\text{absorbance} = 1.9 \times 10^{-4} + 0.23 [\text{Zn}]$  ( $r = 0.9999$ ;  $[\text{Zn}] = 0$  to  $1.0 \mu\text{g/mL}$ ). The limit of detection (LOD) based on three times the standard deviation ( $n = 30$ ) of the blank (3 mol/L nitric acid) was found to be  $1.1 \mu\text{g/m}^3$  Zn. The relationship between the absorbance signal and the zinc concentration was found to be linear over the range  $3.7 - 222.2 \mu\text{g/m}^3$  for a sampling time of 15 min. The precision of the continuous analytical method was checked for 11 real air samples collected at the same time under the sampling conditions described in the optimization process. The mean  $\pm$  standard deviation obtained was  $75.4 \pm 1.2 \mu\text{g/m}^3$  Zn, which results in a relative standard deviation of 1.6%. The sample throughput of the zinc determination, taking into account the global process, was ca. 11 samples per hour.

### Determination of Zinc in Workplace Samples

Three air samples were analyzed by the proposed procedure and another three were analyzed by the INSHT MTA/MA-025/A92 method.<sup>[16]</sup> Thus, the zinc content found was  $146.9 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . As the zinc content found by using the reference method is  $147.5 \pm 2.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , the analytical recovery was 99.6%, which confirms the accuracy of the proposed procedure.

The concentrations of Zn at the workplace investigated (up to  $147.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) were far below the occupational exposure limit value (VLA) for zinc fumes prescribed by Spanish regulations ( $5000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ).

### CONCLUSIONS

The applied continuous procedure was found to be a reliable and sensitive method for the determination of Zn in welding fumes. The main goals obtained with the proposed method are reduction of sample contamination as well as analyte losses because less manipulation of the sample is required. Furthermore, reagent amounts are reduced, and the sample preparation time is minimized. The method avoids the use of concentrated nitric or/and perchloric acids in a conventional acid digestion procedure; for example, INSHT MTA/MA-025/A92 method requires at least 5 mL of concentrated nitric acid.<sup>[16]</sup>

### REFERENCES

1. U.S. Occupational Safety & Health Administration (OSHA) Available at <http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/weldingfumes/index.html>.
2. Kuschner, W. G.; D'Alessandro, A.; Wong, H.; Blanc, P. D. Early pulmonary cytokine responses to zinc oxide fume inhalation. *Environ. Res.* **1997**, 75 (1), 7–11.
3. Fuortes, L.; Schenck, D. Marked elevation of urinary zinc levels and pleural-friction rub in metal fume fever. *Vet. Hum. Toxicol.* **2000**, 42 (3), 164–5.
4. Tandon, R. K.; Payling, R.; Chenhall, B. E.; Crisp, P. T.; Ellis, J.; Baker, R. S. Application of X-ray photoelectron spectroscopy to the analysis of stainless-steel welding aerosols. *Appl. Surface Sci.* **1985**, 20 (4), 527–37.
5. Haddad, E.; Zikovsky, L. Determination of aluminium, arsenic, cobalt, chromium, caesium, iron, manganese, antimony, scandium, tungsten, and zinc in the workroom air by instrumental neutron activation analysis. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **1985**, 93 (6), 371–8.
6. North, M. R.; Haswell, S. J. Elemental determination of welding fumes by X-ray fluorescence spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **1988**, 3 (5), 687–94.
7. Foster, D. F. Sputnik-generated multi-element aerosol-on-filter standards for XRF measurement of harmful elements in workplace air. *X-Ray Spectrom.* **2000**, 29, 467–74.
8. Grosser, Z. A. Atomic absorption of industrial hygiene samples. *At. Spectrosc.* **1988**, 9 (1), 1–5.



9. Yu, I. J.; Kim, K. J.; Chang, H. K.; Song, K. S.; Han, K. T.; Han, J. H.; Maeng, S. H.; Chung, Y. H.; Park, S. H.; Chung, K. H.; Han, J. S.; Chung, H. K. Pattern of deposition of stainless steel welding fume particles inhaled into the respiratory systems of sprague-dawley rats exposed to a novel welding fume generating system. *Toxicol. Lett.* **2000**, *116* (1–2), 103–111.
10. Wesselkamper, S. C.; Chen, L. C.; Gordon, T. Development of pulmonary tolerance in mice exposed to zinc oxide fumes. *Toxicol. Sci.* **2001**, *60*, 144–51.
11. Matczak, W.; Gromiec, J. Evaluation of occupational exposure to toxic metals released in the process of aluminium welding. *Appl. Occup. Environ. Hygiene* **2002**, *17* (4), 296–303.
12. Sung, J. H.; Choi, B.; Maeng, S.; Kim, S.; Chung, Y. H.; Han, J. H.; Song, K. S.; Lee, Y.; Cho, Y.; Cho, M.; Kim, K. J.; Hyun, Jin S.; Yu, I. J. Recovery from welding-fume-exposure-induced lung fibrosis and pulmonary function changes in Sprague Dawley rats. *Toxicol. Sci.* **2004**, *82* (2), 608–613.
13. McNeilly, J. D.; Jimenez, L. A.; Clay, M. F.; MacNee, W.; Howe, A.; Heal, M. R.; Beverland, I. J.; Donaldson, K. Soluble transition metals in welding fumes cause inflammation via activation of NF- $\kappa$ B and AP-1. *Toxicol. Lett.* **2005**, *158* (2), 152–7.
14. U.S. Occupational Safety & Health Administration (OSHA). Available at <http://www.osha.gov/dts/sltc/methods>.
15. U.S. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Available at <http://www.cdc.gov/niosh/nmam>.
16. National Institute of Security and Hygiene in the Work (INSHT). Available at [http://www.mtas.es/insht/mta/MA\\_025\\_A92.htm](http://www.mtas.es/insht/mta/MA_025_A92.htm).
17. Luque de Castro, M. D.; Luque-García, J. L. *Acceleration and Automation of Solid Sample Treatment*; Elsevier: Amsterdam, 2002.
18. Yebra, M. C.; Moreno-Cid, A.; Cancela, S.; Cespón, R. M. Flow injection AAS determination of zinc in milk powder and infant formula using continuous ultrasound-assisted dissolution for soluble solid sample preparation. *At. Spectrosc.* **2003**, *24* (6), 218–21.
19. Yebra, M. C.; Moreno-Cid, A.; Cespón, R.; Cancela, S. Preparation of a soluble solid sample by a continuous ultrasound assisted dissolution system for the flow-injection atomic absorption spectrometric determination of iron in milk powder and infant formula. *Talanta* **2004**, *62* (2), 403–6.
20. Harper, S. L.; Walling, J. F.; Holland, D. M.; Pranger, L. J. Simplex optimization of multielement ultrasonic extraction of atmospheric particulates. *Anal. Chem.* **1983**, *55* (9), 1553–7.
21. Ashley, K. Ultrasonic extraction of heavy metals from environmental and industrial hygiene samples for their subsequent determination. *Trends Anal. Chem.* **1998**, *17* (6), 366–72.



Artículo II

**FAST ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF COPPER,  
IRON, MANGANESE AND ZINC FROM HUMAN HAIR SAMPLES  
PRIOR TO FLOW INJECTION FLAME ATOMIC ABSORPTION  
SPECTROMETRIC DETECTION**

M. C. Yebra-Biurrun, R. M. Cespón-Romero

*Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2007) **388**:711–716





# Fast ultrasound-assisted extraction of copper, iron, manganese and zinc from human hair samples prior to flow injection flame atomic absorption spectrometric detection

M. C. Yebra-Biurrun · R. M. Cespón-Romero

Received: 28 December 2006 / Revised: 21 February 2007 / Accepted: 13 March 2007 / Published online: 3 April 2007  
© Springer-Verlag 2007

**Abstract** A dynamic ultrasound-assisted extraction procedure utilizing diluted nitric acid was developed for the determination of copper, iron, manganese and zinc in human hair taken from workers in permanent contact with a polluted environment. The extraction unit of the dynamic ultrasound-assisted extraction system contains a minicolumn into which a specified amount of hair (5–50 mg) is placed. Once inserted into the continuous manifold, trace metals were extracted at  $3 \text{ mL min}^{-1}$  with  $3 \text{ mol L}^{-1}$  nitric acid under the action of ultrasound for 2 min for zinc and 3 min for copper, iron and manganese determination, and using an ultrasonic water-bath temperature of  $70^\circ\text{C}$  for zinc and  $80^\circ\text{C}$  for copper, iron and manganese determination. The system permits the direct analysis of hair and yields concentrations with relative standard deviations of  $<3\%$  ( $n=11$ ). The applicability of the procedure was verified by analysing human hair samples from workers exposed to welding fumes, and its accuracy was assessed through comparison with a conventional sample dissolution procedure and the use of a certified reference material (BCR 397, human hair).

**Keywords** Dynamic ultrasound-assisted extraction · Hair of occupationally exposed workers · Copper · Iron · Manganese · Zinc · Atomic absorption spectrometry

## Introduction

The monitoring of trace metals such as copper, iron, manganese and zinc in human hair is a topic that has

attracted the interest of researchers from the industrial hygiene field who wish to evaluate exposure to metals in occupational environments. Copper is found in many alloys (monel, brass and bronze), as well as in welding electrodes, and it can cause respiratory irritation, nausea and metal fume fever. Iron is a very common constituent of welding fumes, and its acute effects include respiratory irritation. Manganese is used in most stainless steel carbon alloys and welding electrodes and it can cause neurological effects. Zinc is present in galvanized metals. Welding and cutting these metals can result in the inhalation of zinc oxide fumes, causing metal fume fever [1–4].

Since hair is a solid sample, its dissolution is usually required in order to determine the trace metals in it by atomic absorption spectrometry. Sample pretreatments that have been used to bring hair samples into solution include dry ashing and several off-line digestions with concentrated mineral acids [5–8]. These latter procedures are unsafe because highly carcinogenic nitrous fumes are commonly formed. Acid extraction procedures assisted by ultrasound are an attractive alternative for sample pretreatment [9–15]. To date, only four off-line procedures involving ultrasound-assisted acid extraction have been described in the literature related to trace metal determinations in hair samples [16–19]. These off-line procedures require two steps: 1) ultrasound-assisted extraction using an ultrasonic probe or an ultrasonic bath, and 2) a centrifugation stage to separate the liquid from the solid phase. The first step is carried out in 10–60 min at  $40$ – $90^\circ\text{C}$ , and the second in 10–20 min, for a sample weight of about 200 mg. Under these conditions, sample throughput is very low. In contrast, if this methodology is carried out in a dynamic mode, high sample throughput can be achieved, because it has been proven that continuous flow of the extraction solution through the sample under ultrasonic irradiation increases

M. C. Yebra-Biurrun (✉) · R. M. Cespón-Romero  
Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology,  
Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela,  
15782 Santiago de Compostela, Spain  
e-mail: qncayebi@usc.es

the extraction efficiency, which is reflected in a reduced extraction time [20–23]. In addition, a only a small sample mass is needed, and the centrifugation step is not required because the sample is placed inside the extraction unit, which retains it and acts as a filter that only allows the liquid phase (the extraction solution) to pass.

The current work focuses on the use of a dynamic ultrasound-assisted extraction (UAE) procedure to extract copper, iron, manganese and zinc from hair samples of workers exposed to welding fumes. Flow injection (FI) flame atomic absorption spectrometry (FAAS) was used to determine the analytes after extraction. Since many parameters could potentially affect the acid extraction process, experimental designs (such as Plackett–Burman and central composite designs) were used throughout the optimisation step.

## Experimental

### Reagents

Chemicals were of ultrapure grade, and ultrapure water with a resistivity of  $18 \text{ MOhm cm}^{-1}$  obtained from a Milli-Q purification device (Millipore Co., Bedford, MA, USA) was used. Copper, iron, manganese and zinc stock standard solutions, each  $1.000 \text{ g L}^{-1}$ , were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Nitric acid 65% and hydrochloric acid 30% were also obtained from Merck. CRM 397 (human hair) was obtained from the Community Bureau of Reference (BCR), Brussels (Belgium).

### Apparatus

A PerkinElmer Model 5000 atomic absorption spectrometer (PerkinElmer, Shelton, CT, USA) was used for copper, iron, manganese and zinc measurements, along with a

deuterium lamp employed as a background correction system. Hollow cathode lamps (PerkinElmer) operating at the recommended level of current were used. The instrument was set to 324.8, 248.3, 279.5 and 213.9 nm for Cu, Fe, Mn and Zn determinations, respectively. The output from the spectrometer was connected to a PerkinElmer Model 50 Servograph Recorder with a range of 5 mV. As can be seen in Fig. 1, the FI system comprises two Gilson Minipuls 3 peristaltic pumps (Gilson, Villiers Le Bel, France) fitted with Viton tubes, an ultrasonic bath with an ultrasonic power of 40 kHz (Selecta, Barcelona, Spain), four Rheodyne injection or switching valves models 5041 and 5301 (Rheodyne, Rohnert Park, USA), and a glass minicolumn (100 mm×3 mm i.d.,) bed volume 700  $\mu\text{L}$ , (Omnifit, Cambridge, UK). The ends of the minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541).

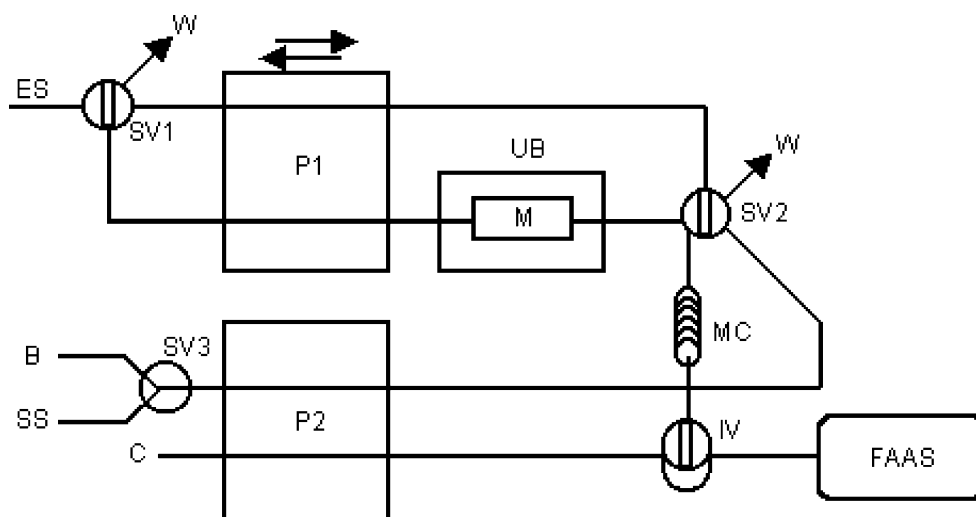
Numerical analyses of experimental designs were performed via the statistical package Statgraphics Plus 5.1 (Manugistic, Inc., Rockville, MD, USA).

### Procedures

#### Hair sample preparation

Hair samples of workers exposed to welding fumes were collected from the vertex of the scalp by cutting from the scalp region (the hair length was 3–5 cm). Prior to analysis, each individual hair sample was cut down to <1 cm in length using stainless steel scissors and mixed to make a representative hair sample. The washing procedure carried out in order to provide an accurate assessment of endogenous metal content was that proposed by the International Atomic Energy Agency (IAEA), and thus hair samples were first washed with ultrapure water, then washed three times with acetone, and they were finally washed again with ultrapure water (three times) [24]. The

**Fig. 1** Experimental set-up used for the continuous UAE process and the FI determinations of copper, iron, manganese and zinc in hair samples. *P1* and *P2*, peristaltic pumps; *ES*, extraction solution; *W*, waste; *UB*, ultrasonic bath; *M*, minicolumn containing the hair sample (extraction cell); *SS*, standard solution; *B*, blank; *IV*, injection valve; *SV1–SV3*, switching valves; *MC*, mixing coil; *C*, carrier (ultrapure water) and *FAAS*, flame atomic absorption spectrometer



hair samples were then dried in an oven at 90 °C and kept in precleaned and labelled polyethylene vials.

#### *Determinations of copper, iron, manganese and zinc in hair samples*

Determinations of copper, iron, manganese and zinc in hair samples were achieved using the approach shown in Fig. 1. The sample (5–50 mg) was placed into a glass minicolumn (the extraction cell of the dynamic UAE system). This extraction cell was positioned in the continuous flow system. The extraction cell was then immersed in the ultrasonic bath (which had been preheated to the required temperature, 70 °C for Zn extraction and 80 °C for the extraction of Cu, Fe and Mn). After this, the extraction circuit was filled with the extraction solution (2 mL of 3 mol L<sup>-1</sup> nitric acid) using the peristaltic pump. The extraction solution was then circulated through the extraction cell for 2 or 3 min to quantitatively extract zinc, copper, iron and manganese, respectively, under ultrasonic irradiation at 3 mL min<sup>-1</sup>. During the extraction step, the direction of flow of the extraction solution stream was changed each 30 s to stop the filter in the extraction cell becoming compacted, which could cause overpressure in the FI system. After the extraction step, the SV2 was switched to its other position, and the extracted metals were circulated through the mixing coil where the acid solution was homogenized. The loop of the injection valve (IV) was then filled with a total volume of 250 µL of the acid extract solution, which was injected into an ultrapure water carrier stream that transported it at 3.5 mL min<sup>-1</sup> to the detector.

Standard solutions containing up to 5, 5, 2 and 1 µg mL<sup>-1</sup> of copper, iron, manganese and zinc, respectively, in the same acid medium as the extraction solution (3 mol L<sup>-1</sup> nitric acid) were also introduced into the flow system, as shown in Fig. 1.

## Results and discussion

### Optimisation of the extraction step

Plackett-Burman 2<sup>7</sup>×3/32 type III resolution designs allowing five degrees of freedom, which involved 12 nonrandomised runs plus one center point, were selected for screening purposes. Seven factors were selected for examination. The factors and their levels (low and high) are described in Table 1. Two factors are related to the composition of the acid solution used as the extraction solution (nitric acid concentration and hydrochloric acid concentration). Other factors relate to the ultrasonic stirring, such as the ultrasonic water-bath temperature and the duration of exposure to ultrasound. The flow-rate of the continuous UAE manifold, the acid solution volume and the hair sample length are also factors that need to be taken into account in the dynamic extraction process. The effect of changing a factor from a low level to a high level value on a selected response such as percentage extraction efficiency was examined, using the following equation: % extraction efficiency = (A/B) × 100, where A is the concentration of the metal obtained with the continuous UAE procedure and B is the metal concentration observed using a conventional acid digestion procedure.

Based on the results from the screening study, it was possible to conclude that the nitric acid concentration and the ultrasonic water-bath temperature were factors that were statistically influential at the 95% confidence level when extracting the target analytes, and the sonication time was statistically influential at the 95% confidence level when extracting copper, iron and manganese. However, the nitric acid concentration was fixed at 3 mol L<sup>-1</sup> because higher acid concentrations could produce serious damage in the nebuliser of the FAAS, and when this concentration was used in one of the runs using the Plackett–Burman designs quantitative extraction efficiencies were achieved (98.5, 99.1, 97.3 and 99.0%, for Cu, Fe, Mn and Zn, respectively).

**Table 1** Parameter ranges tested for each target analyte in each of the experimental designs applied, and the optimal values found for these parameters, as used in the continuous UAE step

Variable	Plackett–Burman 2 <sup>7</sup> ×3/32 factorial design						Central composite design, 2 <sup>2</sup> + star					
	Low	High	Optimum				Low	High	Optimum			
			Cu	Fe	Mn	Zn			Cu	Fe	Mn	Zn
Nitric acid concentration (mol L <sup>-1</sup> )	0	3	3	3	3	3	–	–	3	3	3	3
Hydrochloric acid concentration (mol L <sup>-1</sup> )	0	3	0	0	0	0	–	–	0	0	0	0
Sonication time (min)	0.5	5	–	–	–	–	3	9	3	3	3	2
Ultrasonic water-bath temperature (°C)	20	70	–	–	–	–	30	80	80	80	80	70
Flow-rate of the continuous UAE manifold (mL min <sup>-1</sup> )	3	6	3	3	3	3	–	–	3	3	3	3
Extraction solution volume (mL)	2	5	2	2	2	2	–	–	2	2	2	2
Hair sample length (cm)	0.5	1	<1	<1	<1	<1	–	–	<1	<1	<1	<1

On the other hand, the flow rate of the continuous manifold, the acid solution volume, the hydrochloric acid concentration and the hair sample length were not statistically influential at the 95% confidence level for the ranges studied. Though increasing the hydrochloric acid concentration has a positive influence, quantitative extraction efficiencies were achieved when the value of this variable was minimised (to 0 mol L<sup>-1</sup>). For all metals, using small volumes of acid solution had a positive estimated effect, and so the minimum value of this variable was chosen (2 mL) in order to optimise the analytical sensitivity. Increasing the flow rate of the continuous manifold had a negative influence on the extraction efficiencies, so the minimum value tested (3 mL min<sup>-1</sup>) was selected for subsequent experiments. For all metals, increasing the hair sample length had a negative estimated effect, but in order to make the sample preparation step as easy as possible, and due to the fact that the estimated effects were small and statistically insignificant, the hair particle size value was fine-tuned outside the experimental design framework. Thus, it was proven that a particle size of <1 cm was small enough to permit quantitative extraction of the metals from the hair samples. This can be explained by the high energy supplied by the ultrasound (frequency of 40 kHz) and the temperature, which increased the contact between the sample and the acid solvent.

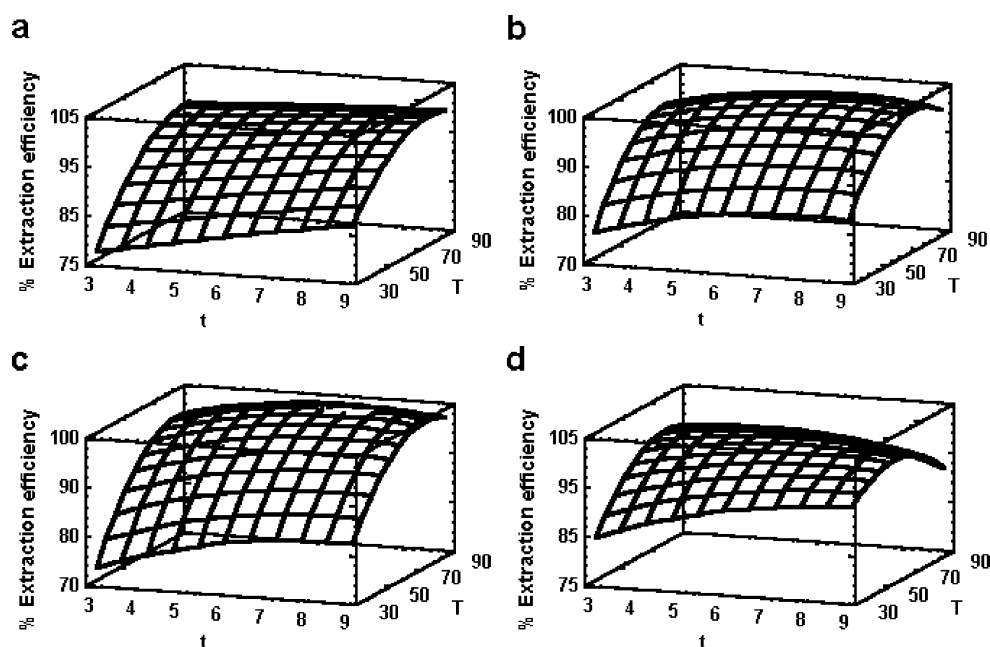
Because the Plackett–Burman design only provides pointers to the optimal design, a new factorial design was performed to fine-tune the sonication time and the ultrasonic water-bath temperature in order to obtain quantitative extraction efficiencies with the minimum values of these variables. To do this, we used an orthogonal central composite design, 2<sup>2</sup> + star with two center points,

resulting in ten nonrandomised runs with four degrees of freedom in the error. An axial distance ( $\alpha$ ) of 1.07809 was selected in order to establish orthogonal conditions. All the other factors were maintained at their optimum values (Table 1). The results obtained confirmed that the ultrasonic water-bath temperature was a statistically influential variable at the 95% confidence level for copper, iron and manganese extraction in the ranges studied (30–80 °C and 3–9 min, for ultrasonic water-bath temperature and the sonication time, respectively). On the other hand, this variable was not a statistically influential factor at the 95% confidence level for zinc extraction. The sonication time was not a statistically influential factor at the 95% confidence level for any of the studied metals. Figure 2 shows the response surfaces for this design for each metal. Across the range of sonication times studied, quantitative extraction efficiencies were obtained when a water-bath temperature of >80 °C was used for Cu, Fe and Mn, and >60 °C for Zn. As interactions between these variables have a positive influence (so that increasing the value of one of them can reduce the value of the other required to achieve quantitative extraction efficiencies), and in order to increase the sample throughput, it was proven that it was possible to reduce the sonication time for zinc extraction (to 2 min) by increasing the water-bath temperature (to 70 °C). Given these findings, we decided to use the optimum operational conditions given in Table 1.

#### Optimisation of parameters involving the FI system

Other flow parameters associated with the copper, iron, manganese and zinc determinations were also optimised. The carrier flow rate was studied between 3 and 6 mL min<sup>-1</sup>

**Fig. 2a–d** Estimated response surfaces from the central composite design 2<sup>2</sup> + star. **a** Cu, sonication time (min) (*t*) vs ultrasonic water-bath temperature (°C) (*T*); **b** Fe, sonication time (min) (*t*) vs ultrasonic water-bath temperature (°C) (*T*); **c** Mn, sonication time (min) (*t*) vs ultrasonic water-bath temperature (°C) (*T*); **d** Zn, sonication time (min) (*t*) vs ultrasonic water-bath temperature (°C) (*T*)





and the injected volume of the acid solution between 100 and 400  $\mu\text{L}$ . The aspiration flow rate of the nebuliser was adjusted to be the same as the flow-rate of the carrier solution. Thus, a carrier flow rate of  $3.5 \text{ mL min}^{-1}$  was chosen as a compromise to obtain the minimum dispersion in the FI system. For the injected volume, it was verified that, as expected, when the volume was increased the sensitivity also increased. Therefore, a volume of 250  $\mu\text{L}$  was chosen, which also allowed us to inject the acid extract several times in order to verify its homogeneity. The mixing coil length was also studied, and it was proven that a mixing coil length of about 400 cm yields total homogenisation of the acid extract, while a longer length makes the analysis time too long, diminishing the sample throughput.

### Features of the method

The detection and quantification limits were calculated using the equations  $\text{LD} = X_{\text{bl}} \pm 3S_{\text{bl}}$  and  $\text{LQ} = X_{\text{bl}} \pm 10S_{\text{bl}}$ , respectively, where  $X_{\text{bl}}$  is the mean and  $S_{\text{bl}}$  the standard deviation of the blank responses obtained from analyses of 30 within-run blanks (3 mol  $\text{L}^{-1}$  nitric acid). The values obtained for the detection and quantification limits were 1.7 and  $5.5 \mu\text{g g}^{-1}$  for copper (sample mass 25 mg), 5.3 and  $17.8 \mu\text{g g}^{-1}$  for iron (sample mass 10 mg), 0.7 and  $2.3 \mu\text{g g}^{-1}$  for manganese (sample mass 50 mg), and 2.1 and  $7.1 \mu\text{g g}^{-1}$  for zinc (sample mass 5 mg). Calibration graphs were obtained by plotting peak heights as a function of the standard concentrations of Cu, Fe, Mn and Zn. Thus, the linear dynamic ranges were  $5.5\text{--}440.0 \mu\text{g g}^{-1}$  for Cu,  $17.8\text{--}1100.0 \mu\text{g g}^{-1}$  for Fe,  $2.3\text{--}88.0 \mu\text{g g}^{-1}$  for Mn and  $7.1\text{--}440.0 \mu\text{g g}^{-1}$  for Zn, with correlation coefficients ( $r^2$ ) of 0.998 for Cu, 0.996 for Fe, 0.997 for Mn and 0.999 for Zn ( $n=7$ ).

In order to evaluate the precision of the continuous analytical method, eleven hair samples from workers

exposed to welding fumes were analysed. The repeatabilities, expressed as the relative standard deviations, were 1.2, 2.9, 1.8, and 2.7% for Cu, Fe, Mn and Zn, respectively.

The standard addition calibration method was used to investigate the effect of the sample matrix on the analyte absorbance. The slopes of the standard addition and calibration curves were not statistically different (Student's  $t$ -test, 95% confidence level), proving that matrix interferences were not present.

A human hair reference material, CRM 397 (BCR), with Cu, Fe, Mn and Zn contents of  $110 \pm 5 \mu\text{g g}^{-1}$  (indicative value),  $580 \pm 10 \mu\text{g g}^{-1}$  (informative value),  $11.2 \pm 0.3 \mu\text{g g}^{-1}$  (informative value), and  $199 \pm 5 \mu\text{g g}^{-1}$  (certified value), respectively, was analysed in order to assess the accuracy of the proposed methodology. The Cu, Fe, Mn and Zn contents obtained for this certified reference material using the proposed methodology (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ ) were  $108.9 \pm 1.4$ ,  $580.7 \pm 9.5$ ,  $11.1 \pm 0.2$  and  $198.9 \pm 3.5 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively, which are in accordance with the certified, indicative or informative values.

**Sample analysis:** determination of copper, iron, manganese and zinc in hair samples of workers exposed to welding fumes

The proposed methodology was applied to hair samples of workers exposed to a greater or lesser degree to welding fumes within the same industry, as well as to hair samples from a control group (who had not been exposed to welding fumes). The results obtained were compared with those achieved using a conventional off-line sample digestion method with concentrated nitric acid and determination by FAAS. The results obtained (expressed in  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) and their standard deviations ( $n=3$ ) are shown in Table 2. To compare the results obtained by these both methods, a paired  $t$ -test was applied. As shown in Table 2, the methods

**Table 2** Results from determinations of copper, iron, manganese and zinc in hair samples ( $n=3$ ) and paired  $t$ -test

Hair sample source	Years in profession	Age	Reference method <sup>a</sup> $\mu\text{g g}^{-1}$				Proposed methodology ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )			
			Cu	Fe	Mn	Zn	Cu	Fe	Mn	Zn
Welder	0.4	18	$20.1 \pm 1.0$	$40.1 \pm 1.5$	$7.5 \pm 0.2$	$115.6 \pm 2.3$	$19.8 \pm 0.8$	$42.9 \pm 0.9$	$6.0 \pm 0.1$	$108.4 \pm 1.0$
Welder	5	25	$48.3 \pm 1.9$	$99.7 \pm 3.6$	$12.9 \pm 0.2$	$117.5 \pm 2.3$	$51.9 \pm 1.1$	$96.2 \pm 2.5$	$11.2 \pm 0.1$	$122.9 \pm 1.0$
Welder	22	41	$59.2 \pm 1.3$	$114.0 \pm 3.4$	$20.7 \pm 0.4$	$199.7 \pm 2.4$	$61.2 \pm 0.8$	$112.6 \pm 2.6$	$22.6 \pm 0.2$	$190.5 \pm 1.1$
Welder	38	56	$79.8 \pm 1.7$	$277.8 \pm 5.3$	$29.7 \pm 0.5$	$222.3 \pm 2.3$	$77.8 \pm 0.7$	$268.2 \pm 2.8$	$31.9 \pm 0.1$	$230.7 \pm 1.0$
Electrician	24	45	$37.1 \pm 1.1$	$49.3 \pm 2.5$	$10.5 \pm 0.1$	$87.4 \pm 1.9$	$35.0 \pm 0.8$	$51.8 \pm 1.6$	$8.2 \pm 0.1$	$89.3 \pm 1.0$
Mechanical	32	51	$41.0 \pm 1.2$	$41.7 \pm 2.5$	$12.9 \pm 0.2$	$100.5 \pm 1.8$	$42.3 \pm 0.8$	$37.1 \pm 1.5$	$10.5 \pm 0.1$	$96.8 \pm 1.0$
Technician	4	29	$24.3 \pm 0.9$	$34.9 \pm 2.5$	$6.3 \pm 0.1$	$79.0 \pm 1.7$	$22.9 \pm 0.8$	$37.1 \pm 1.5$	$5.1 \pm 0.1$	$70.2 \pm 1.0$
Control 1	—	18	$7.1 \pm 1.0$	$27.9 \pm 2.5$	$1.0 \pm 0.3$	$49.0 \pm 2.1$	$7.8 \pm 0.8$	$29.7 \pm 1.5$	$1.1 \pm 0.1$	$44.6 \pm 1.0$
Control 2	—	37	$22.7 \pm 1.0$	$43.5 \pm 2.5$	$6.3 \pm 0.2$	$81.7 \pm 1.9$	$21.2 \pm 0.8$	$41.8 \pm 1.1$	$5.3 \pm 0.1$	$79.4 \pm 1.0$
Control 3	—	55	$36.8 \pm 1.0$	$45.1 \pm 2.5$	$7.0 \pm 0.2$	$87.4 \pm 1.9$	$34.2 \pm 0.4$	$46.7 \pm 1.5$	$6.8 \pm 0.1$	$86.4 \pm 1.0$

Critical value of  $t$  ( $P=0.05$ ) = 2.26; experimental values of  $t$ : 0.35, 0.78, 1.16 and 1.12 for Cu, Fe, Mn and Zn, respectively

<sup>a</sup> Off-line acid digestion and FAAS determination

do not give significantly different values; the results from the two methods agree at the 95% confidence level. All of the samples have Cu, Fe, Mn and Zn concentrations that fall within the overall metal concentration ranges reported in the literature for hair samples (Cu: 6.0–293  $\mu\text{g g}^{-1}$ , Fe: 10–900  $\mu\text{g g}^{-1}$ , Mn: 0.04–24  $\mu\text{g g}^{-1}$  and Zn: 53.7–327  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) [25, 26]. However, the highest concentrations of the four metals were obtained for workers exposed directly to welding fumes (welders). These results show that hair composition reflects the influence of the polluted environment on workers' health, and that it could be used as a bioindicator in toxicological studies to evaluate exposure to metals in workplace environment.

## Conclusions

The use of this dynamic approach allowed the target analytes to be extracted in a shorter time than required by previous off-line UAE methods [13–16]. The extraction time was reduced 3–20-fold and a centrifugation step (10–20 min) was not necessary. In addition, the UAE with dilute nitric acid is a much simpler and safer procedure than conventional digestion procedures, and it offers other advantages too, such as low reagent costs and reduced waste, making it an environmental friendly methodology.

## References

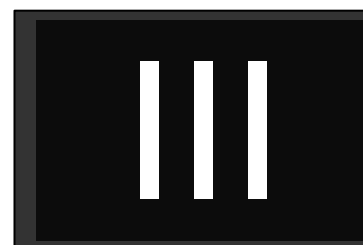
- Kucera J, Bencko V, Tejral J, Borska L, Soukal L, Randa Z (2004) *J Radioanal Nucl Chem* 259:7–11
- Chai ZF, Qian QF, Feng XQ, Zhang PQ, Liu NQ, Feng WY, Kuang MX, Wang HY, Zhang YZ (2004) *J Radioanal Nucl Chem* 259:153–156
- Khalique A, Shah MH, Jaffar M, Shaheen N, Tariq SR, Manzoor S (2006) *Toxicol Environ Chem* 88:697–704
- Sari H, Tuzen M, Mendil D, Hasdemir E (2006) *Trace Elements Electrol* 23:1–4
- Stoeppler M, Valenta P, Nuernberg HW (1979) *Fresenius' Z Anal Chem* 297:22–34
- Kojima I, Kato A, Iida C (1992) *Anal Chim Acta* 264:101–106
- Dong X, Nakaguchi Y, Hiraki K (1998) *Anal Sci* 14:785–789
- Afridi HI, Kazi TG, Jamali MK, Kazi GH, Arain MB, Jalbani N, Shar GQ (2006) *Spectrosc Lett* 39:203–214
- Luque de Castro MD, Luque-García JL (2002) *Acceleration and automation of solid sample treatment*. Elsevier, Amsterdam
- Maduro C, Vale G, Alves S, Galesio M, Gomes da Silva MDR, Fernández C, Catarino S, Rivas MG, Mota AM, Capelo JL (2006) *Talanta* 68:1156–1161
- Salgado SG, Quijano Nieto MA, Bonilla Simon MM (2006) *Talanta* 68:1522–1527
- Kazi TG, Jamali MK, Siddiqui A, Kazi GH, Arain MB, Afridi HI (2006) *Chemosphere* 63:411–420
- Manutsewee N, Aeungmaitrepirom W, Varanusupakul P, Imyim A (2006) *Food Chem* 101:817–824
- De Souza RM, Saraceno AL, Da Silveira CLP, Aucelio RQ (2006) *J Anal Atom Spectrom* 21:1345–1349
- Soriano S, Netto ADP, Cassella RJ (2007) *J Pharm Biomed Anal* 43:304–310
- Bermejo-Barrera P, Moreda-Pineiro A, Bermejo-Barrera A (2000) *J Anal Atom Spectrom* 15:121–130
- Bermejo-Barrera P, Muniz-Naveiro O, Moreda-Pineiro A, Bermejo-Barrera A (2000) *Forensic Sci Int* 107:105–120
- Kazi TG, Afridi HI, Kazi GH, Jamali MK, Arain MB, Jalbani N (2006) *Clin Chim Acta* 369:52–60
- Kazi TG, Afridi HI, Jamali MK, Kazi GH, Arain MH, Jalbani N, Sarfraz RA, Shar GQ (2006) *J AOAC Int* 89:1410–1416
- Yebra MC, Moreno-Cid A (2002) *Spectrochim Acta* 57B:967–974
- Yebra MC, Moreno-Cid A, Cespón R, Cancela S (2004) *Talanta* 62:403–406
- Priego-Capote F, Luque de Castro MD (2004) *Anal Bioanal Chem* 378:1376–1381
- Luque de Castro MD, Priego Capote F (2006) *Analytical applications of ultrasound*. Elsevier, Amsterdam
- Ryabukin YS (1978) *Activation analysis of hair as an indicator of contamination of man by environmental trace element pollutants (Report IAEA/RL/50)*. IAEA, Vienna
- Caroli S, Alimonti A, Coni E, Petrucci F, Senofonte O, Violante N (1994) *Crit Rev Anal Chem* 24:363–398
- Senofonte O, Violante N, Caroli S (2000) *J Trace Elements Med Biol* 14:6–13

Artículo III

**FLOW INJECTION DETERMINATION OF LEAD AND CADMIUM  
IN HAIR SAMPLES FROM WORKERS EXPOSED TO WELDING  
FUMES**

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*Analytica Chimica Acta* (2007) **600**: 221–225





available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aca](http://www.elsevier.com/locate/aca)

# Flow injection determination of lead and cadmium in hair samples from workers exposed to welding fumes

R.M. Cespón-Romero, M.C. Yebra-Biurrun\*

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 5 October 2006

Received in revised form

14 November 2006

Accepted 29 November 2006

Published on line 6 December 2006

### Keywords:

Continuous ultrasonic extraction

Hair of occupationally exposed workers

Lead

Cadmium

Flame atomic absorption spectrometry

## ABSTRACT

A flow injection procedure involving continuous acid leaching for lead and cadmium determination in hair samples of persons in permanent contact with a polluted workplace environment by flame atomic absorption spectrometry is proposed. Variables such as sonication time, nature and concentration of the acid solution used as leaching solution, leaching temperature, flow-rate of the continuous manifold, leaching solution volume and hair particle size were simultaneously studied by applying a Plackett–Burman design approach. Results showed that nitric acid concentration (leaching solution), leaching temperature and sonication time were statistically significant variables (confidence interval of 95%). These last two variables were finally optimised by using a central composite design. The proposed procedure allowed the determination of cadmium and lead with limits of detection 0.1 and 1.0  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively. The accuracy of the developed procedure was evaluated by the analysis of a certified reference material (CRM 397, human hair, from the BCR). The proposed method was applied with satisfactory results to the determination of Cd and Pb in human hair samples of workers exposed to welding fumes.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Human hair has been demonstrated to be one of the major vehicles of excretion of trace elements from the human body. Therefore, the concentration of toxic elements such as cadmium and lead in human hair is a biological index for monitoring occupational exposure. This biological material is an interesting matrix because concentrations in hair are up to 10-fold higher than the levels found in blood or urine samples. Other advantages are the simplicity of sampling, storing and transport [1].

Most analytical methods propose atomic absorption spectrometry to determine the metal content in hair samples. As this is a solid sample, its dissolution to destroy the organic matter and convert it into a liquid is usually mandatory

in order to determine trace metals. Thus, different sample pre-treatments for trace elements determination have been proposed, mainly involving acid digestion [2–6]. Nevertheless, these procedures are time consuming, prone to analyte losses and require large volumes of mineral acids. In addition, nitrous fumes, highly carcinogenic, are commonly formed during these procedures. In contraposition, it has been proven that ultrasonic assisted extraction (UAE) with diluted acids carried out in a batch mode is an excellent and effective way of extracting a number of analytes from different types of samples, including hair [7]. Nevertheless, dynamic or continuous UAE flow systems have been also proposed to improve the analytical conditions, because these avoid certain operations such as centrifugation, filtration and washing and their associated errors. Continuous UAE systems are faster than those

\* Corresponding author. Tel.: +34 981563100; fax: +34 981595012.

E-mail address: [qncayebi@usc.es](mailto:qncayebi@usc.es) (M.C. Yebra-Biurrun).

0003-2670/\$ – see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.aca.2006.11.075

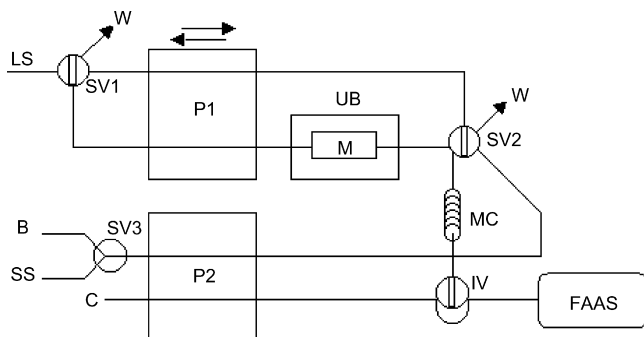
performed in the batch mode and as they are implemented using flow injection (FI) systems, allow the on-line detection of the analytes [8–12].

The aim of the present work has been the optimisation of accelerated continuous acid UAE procedures using a FI system to interface the dynamic extraction manifold with the flame atomic absorption spectrometer to extract cadmium and lead from human hair samples of workers exposed to welding fumes and monitoring these trace metals on-line. Due to there being many variables that affect the acid extraction process, experimental designs, such as Plackett–Burman and central composite designs, have been used throughout the optimisation step.

## 2. Experimental

### 2.1. Apparatus

A Perkin–Elmer Model 5000 atomic absorption spectrometer (Perkin–Elmer, Shelton, CT, USA) and a deuterium lamp as background correction system, was used for cadmium and lead measurements. Hollow cathode lamps (Perkin–Elmer) operating at recommended current were used. The instrument was set at 228.8 and 217.0 nm for cadmium and lead determination, respectively. The spectrometer output was connected to a Perkin–Elmer Model 50 Servograph Recorder with a range of 5 mV. As can be seen in Fig. 1, the FI system comprises two Gilson Minipuls 3 peristaltic pumps (Gilson, Villiers Le Bel, France) fitted with Viton tubes, an ultrasonic bath with an ultrasound power of 40 kHz (Selecta, Barcelona, Spain), four Rheodyne injection or switching valves models 5041 and 5301 (Rohnert Park, USA), a glass minicolumn of 100 mm × 3 mm i.d., bed volume 700  $\mu$ L (Omnifit, Cambridge, UK). The ends of minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541).



**Fig. 1 – Dynamic UAE manifold to extract cadmium and lead from human hair samples and FI manifold for on-line determination by FAAS. P1 and P2: peristaltic pumps; LS: leaching solution; W: waste; UB: ultrasonic bath; M: minicolumn containing the sample (extraction unit); SV1, SV2 and SV3: selection valves; IV: injection valve; MC: mixing coil; B: blank solution; SS: standard solution; C: carrier (ultrapure water); FAAS: flame atomic absorption spectrometer.**

Numerical analyses of experimental designs were performed by means of the statistical package Statgraphics Plus 5.1 (Manugistic, Inc., Rockville, MD, USA).

### 2.2. Reagents

Chemicals were of ultrapure grade, using ultrapure water with a resistivity of 18 M $\Omega$  cm<sup>−1</sup>, which was obtained from a Milli-Q purification device (Millipore Co., Bedford, MA, USA). Cadmium and lead stock standard solutions, 1.000 g L<sup>−1</sup> were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Nitric acid 65% and hydrochloric acid 30% were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). CRM 397, human hair was obtained from the Community Bureau of Reference (BCR), Brussels (Belgium).

### 2.3. Human hair samples and sample preparation

Hair samples of workers exposed to welding fumes were collected from the vertex of the scalp by cutting from the scalp region and the hair length varied between 3 and 5 cm. Prior to analysis, each individual hair samples were cut into a size less than 1 cm using stainless steel scissors and mixed to make a representative hair sample. The washing procedure carried out in order to provide an accurate assessment of endogenous metal content was that proposed by International Atomic Energy Agency (IAEA) [13]. Finally, the hair samples were dried in an oven at 90 °C and kept into pre-cleaned and labelled polyethylene vials.

### 2.4. Analytical procedure

The determination of cadmium and lead in hair samples was developed using the approach shown in Fig. 1. This dynamic manifold allows the continuous acid extraction of these trace metals and then, their FI determination by flame atomic absorption spectrometry. Each hair sample (about 125 mg) was weighed and placed into a minicolumn (extraction unit). After, the minicolumn containing the hair sample was assembled to the continuous extraction manifold and then, placed into the ultrasonic bath (preheated to the required temperature, 80 °C). The extraction step starts when 2 mL of 3 mol L<sup>−1</sup> nitric acid was pumped into the extraction circuit. Thus, once loaded the extraction circuit, SV1 was switched to its other position. Thus, the continuous extraction system including the extraction unit and the peristaltic pump (P1) became a closed circuit where the acid leaching solution circulated through the extraction unit at 3 mL min<sup>−1</sup> under ultrasonic irradiation during 4 or 2 min for quantitative extraction of cadmium and lead, respectively. During this leaching step, the direction of the flow was changed every complete circuit cycle in order to avoid compactness of the sample into the minicolumn that could cause overpressure in the flow system. After extraction, SV2 is switched to its other position, and the acid extract was circulated through the mixing coil where the solution was homogenized. Then, the loop of the injection valve (IV) was filled with a total volume of 250  $\mu$ L of solution, which was injected into an ultrapure water carrier stream that transport it at 3.5 mL min<sup>−1</sup> to the detector.

Standard solutions containing up to 2 and 20 and  $\mu$ g mL<sup>−1</sup> for cadmium and lead, respectively, in the same acid medium

as the leaching solution (3 mol L<sup>-1</sup> nitric acid) were introduced into the flow system as is shown in Fig. 1.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimisation of the dynamic UAE manifold to extract cadmium and lead from human hair samples

The variables which affect continuous UAE are sonication time, nature and concentration of the acid solution used as leaching solution, leaching temperature, flow-rate of the continuous manifold, leaching solution volume and hair particle size. A Plackett–Burman 2<sup>7</sup>×3/32 type III resolution design allowing 5 degrees of freedom involved 12 non-randomised runs plus one center point was selected for a screening study of the behaviour of the main factors affecting the leaching process. The upper and lower values given to each factor were selected from the available data and experience gathered in preliminary experiments (Table 1). The conclusions of this screening study were that nitric acid concentration (leaching solution), leaching temperature and sonication time were statistically significant variables with positive effects (confidence interval of 95%). The response functions, which have been fitted to the data, are shown in Table 1. Therefore, a new design was performed in order to fine tune the value of these factors. Nevertheless, nitric acid concentration was fixed to 3 mol L<sup>-1</sup> because higher acid concentrations can produce serious damages in the spectrometer nebuliser of flame atomic absorption spectrometer and with this concentration and without hydrochloric acid quantitative recoveries were achieved in one of the runs of the Plackett–Burman design (97.1 and 95.7% for cadmium and lead, respectively). On the other hand, the hydrochloric acid concentration and the leaching solution volume had positive effects, and the flow-rate of the continuous extraction manifold and hair particle size had negative effects, but they were not statistically influen-

tial factors. Thus, as was proven that the leaching solution could be only diluted nitric acid, a 0 mol L<sup>-1</sup> hydrochloric acid concentration was selected. For the leaching solution volume the highest value tested (5 mL), and for the flow-rate of the continuous extraction manifold and hair particle size the minimum values tested (3 mL min<sup>-1</sup> and 5 mm) were selected for subsequent experiments. An orthogonal central composite design, 2<sup>2</sup>+star with two center points, resulting in 10 non-randomised runs with 4 error degrees of freedom. The results obtained confirmed that sonication time was not a statistically influential factor. However, leaching temperature was a statistically influential factor at the 95% confidence level in the ranges studied (30–80 °C and 2–9 min, respectively). Fig. 2 shows the response surfaces for this design for these two variables. Given these findings, in order to increase the sampling frequency, we decided to work with the optimum operational conditions given in Table 1 under the optimum values heading. Finally, as with the aim of increase analytical sensitivity and to make easier the sample preparation step and due to the fact that the estimated effects are small and statistically insignificant, leaching solution volume and hair particle size were fine-tune outside the framework of experimental designs. Thus, was proven that a volume of 2 mL of 3 mol L<sup>-1</sup> nitric acid as leaching solution and a particle size until 1 cm were enough to extract quantitatively cadmium and lead from hair samples. This can be explained by the high energy supplied by the ultrasound (frequency of 40 kHz) and the temperature, which increased the contact between the sample and the acid solvent.

#### 3.2. Optimisation of parameters involving the FI system

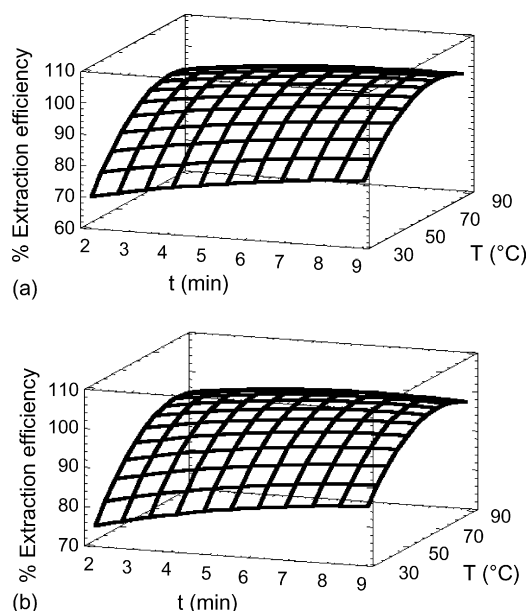
Other flow parameters involving cadmium and lead determination were also optimised. It was proven that a mixing coil length of about 400 cm achieves a total homogenisation of the acid extract, while longer length would increase too

**Table 1 – Tested ranges for the target analytes in experimental designs and optimal values for the variables related to the continuous UAE step**

Variable	Key	Plackett–Burman 2 <sup>7</sup> ×3/32 factorial design <sup>*</sup>		Central composite design, 2 <sup>2</sup> +star		Optimum	
		Low	High	Low	High	Cd	Pb
Nitric acid concentration (mol L <sup>-1</sup> )	A	0	3	–	–	3	3
Hydrochloric acid concentration (mol L <sup>-1</sup> )	B	0	3	–	–	0	0
Sonication time (min)	C	0.5	5	2	9	4	2
Leaching temperature (°C)	D	20	70	30	80	80	80
Flow-rate of the continuous UAE manifold (mL min <sup>-1</sup> )	E	3	6	–	–	3	3
Leaching solution volume (mL)	F	2	5	–	–	2	2
Hair particle size (cm)	G	0.5	1	–	–	<1	<1

<sup>\*</sup> The equations of the fitted model are: % Cd recovery =  $-2.87342 + 15.5778 \times A + 5.67778 \times B + 5.08889 \times C + 0.582667 \times D - 4.13333 \times E + 0.866,667 \times F - 4.3 \times G$ ; % Pb recovery =  $0.355484 + 14.8833 \times A + 6.80556 \times B + 5.81852 \times C + 0.745 \times D - 5.40556 \times E + 1.11667 \times F - 5.45 \times G$ ; where the values of the variables are specified in their original units.





**Fig. 2** – Estimated response surfaces from the central composite design  $2^2 + \text{star}$ . (a) Cd: sonication time (t)/leaching temperature (T); (b) Pb: sonication time (t)/leaching temperature (T).

much the analysis time, diminishing in this way the sampling frequency. The carrier flow rate and the injected volume were also studied. The carrier flow rate was studied between 3 and  $6 \text{ mL min}^{-1}$  and the injected volume of the acid solution between 100 and  $400 \mu\text{L}$ . The aspiration flow-rate of the nebuliser was adjusted to be the same as the flow-rate of the carrier solution. Although the higher aspiration flow-rate provides better sensitivity, at the same time a higher dispersion coefficient takes place because the carrier flow-rate is increasing. Therefore, a carrier flow-rate of  $3.5 \text{ mL min}^{-1}$  (dispersion equal to 1.1) was chosen as a compromise to obtain the minimum dispersion in the flow system. With regard to the injected volume it was verified that, as it is logical, when the volume was increased the sensitivity was increased. Therefore, a volume of  $250 \mu\text{L}$  was chosen, which in addition, allows to inject several times the acid extract verifying its homogeneity.

### 3.3. Analytical figures of merit

Calibration graphs were obtained by using peak height as a function of the standard concentrations of cadmium and lead. Good linearity was obtained up to  $35.2$  and  $352.0 \mu\text{g g}^{-1}$  with a correlation coefficient ( $r^2$ ) of  $0.9998$  ( $n=7$ ) for both trace metals. The standard addition calibration method was used to investigate the effect of the sample matrix on the analyte absorbance. Thus, the slopes of the standard additions and calibration curves were not statistically different (Student's  $t$ -test, 95% confidence level), proving the absence of matrix interferences. The detection limits for the two metals calculated based on three times the standard deviation ( $n=30$ ) of the blank were  $0.1$  and  $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$  for cadmium and

lead, respectively. In order to evaluate the precision of the continuous analytical method, this was checked for the analysis of 11 hair samples. Thus, the repeatability, expressed as relative standard deviation was 2.9 and 2.7 for cadmium and lead, respectively. A human hair reference material, CRM 397 (BCR), with a Cd and Pb content of  $0.521 \pm 0.024 \mu\text{g g}^{-1}$  and  $33.0 \pm 1.2 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively, was analysed in order to assess the accuracy of the proposed methodology. Cd and Pb contents obtained for this certified reference material by the proposed methodology (mean  $\pm$  S.D.,  $n=3$ ) were  $0.519 \pm 0.064$  and  $33.0 \pm 1.2 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively, which are in accordance with the certified values. Sample throughputs of the cadmium and lead determinations, taking into account the global process, were ca. 14 and 27 samples per hour, respectively.

### 3.4. Determination of Cd and Pb in hair samples of workers exposed to welding fumes

The proposed methodology was applied to seven hair samples of workers exposed to welding fumes. These hair samples presented Cd and Pb concentrations ranging from  $0.5$  to  $4.9 \mu\text{g g}^{-1}$  and from  $10.6$  to  $96.2 \mu\text{g g}^{-1}$ , and they agree with reported values for these trace metals in this matrix [14].

## 4. Conclusions

A simple and fast methodology for the continuous acid leaching of cadmium and lead from hair samples and their FI determinations by flame atomic absorption spectrometry was developed for first time for this sample matrix. The use of diluted nitric acid as leaching solution and ultrasonic energy to assist the dynamic acid extraction of these trace metals from hair samples avoided the need of use concentrated acids and nitrous vapours formation. Furthermore, is possible a reduction of sample contamination as well as analyte losses because less manipulation of the sample is required, and reagents amounts are reduced and the sample preparation time is minimised.

## REFERENCES

- [1] E. Clayton, K.K. Wooller, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1075.
- [2] W. Wasiak, W. Ciszewska, A. Ciszewski, *Anal. Chim. Acta* 335 (1996) 201.
- [3] J. Kubova, V. Hanakova, J. Medved, V. Stresko, *Anal. Chim. Acta* 337 (1997) 229.
- [4] J. Morton, V.A. Carolan, P.H.E. Gardiner, *Anal. Chim. Acta* 455 (2002) 23.
- [5] J.L. Manzoori, A. Bavili-Tabrizi, *Anal. Chim. Acta* 470 (2002) 215.
- [6] H.I. Afridi, T.G. Kazi, M.K. Jamali, G.H. Kazi, M.B. Arain, N. Jalbani, G.Q. Shar, *Spectrosc. Lett.* 39 (2006) 203.
- [7] P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, A. Bermejo-Barrera, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 121.
- [8] J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, *Acceleration and Automation of Solid Sample Treatment*, Elsevier, Amsterdam, 2002.
- [9] M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 121.



- 
- [10] M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, *Spectrochim. Acta B* 57 (2002) 967.
- [11] J. Ruiz-Jiménez, J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, *Anal. Chim. Acta* 480 (2003) 231.
- [12] J. Ruiz-Jiménez, M.D. Luque de Castro, *Anal. Chim. Acta* 502 (2004) 75.
- [13] Y.S. Ryabukin, Activation analysis of hair as an indicator of contamination of man by environmental trace element pollutants, IAEA Report IAEA/RL/50, Vienna, 1978.
- [14] S. Caroli, A. Alimonti, E. Coni, F. Petrucci, O. Senofonte, N. Violante, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1994) 363.



Artículo IV

**APPLICATION OF FACTORIAL DESIGNS FOR OPTIMISATION  
OF ON-LINE CADMIUM, LEAD AND NICKEL DETERMINATION  
IN WELDING FUMES BY ATOMIC ABSORPTION  
SPECTROMETRY**

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*International Journal of Environmental Analytical Chemistry* (aceptado)





## RESEARCH ARTICLE

### Application of factorial designs for optimization of on-line determination of cadmium, lead and nickel in welding fumes by atomic absorption spectrometry

Rosa M. Cespón-Romero and M.C. Yebra-Biurrun\*

*Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology,  
University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

*(Received 10 October 2007; final version received 9 December 2007)*

A flow-injection flame atomic absorption spectrometric method using diluted nitric acid and ultrasound energy to assist metals acid leaching from welding fumes was optimized. Several variables were simultaneously studied by applying a Plackett-Burman design. Results showed that the statistically significant variables (95%) were concentration of nitric acid solution for cadmium, lead and nickel, ultrasonic water-bath temperature for lead and nickel, and sonication time for nickel. Factors such as ultrasonic water-bath temperature and sonication time were finally optimized by using a central composite design. Detection limits were 0.1, 1.0 and  $3.4 \mu\text{g m}^{-3}$ , and repeatability ( $n=11$ ) were 3.2, 1.9 and 1.6%, for cadmium, lead and nickel, respectively. The proposed method was applied to the determination of cadmium, lead and nickel in welders' workplace environments.

**Keywords:** flow analysis; cadmium; lead; nickel; acid leaching; air analysis

#### 1. Introduction

Welding is still a common and a highly skilled occupation, but there are several hazardous agents associated with welding processes, among them metallic particulates and their oxides formed by the vaporization and oxidation of metal during the welding process.<sup>1</sup> Welding fume components are harmful to human health. They may be toxic or an irritant to the respiratory system and may cause pulmonary edema, chronic bronchitis, emphysema, pneumonia, asthma, welder's lung and metal fume fever. Furthermore, some of them, for example arsenic, hexavalent chromium, nickel, beryllium and cadmium, exhibit carcinogenic activity.<sup>2</sup> These health hazards require not only worker protection, but also the need for a regular monitoring of trace metals, such as cadmium, lead and nickel, in the workplace air.

The analysis of solid samples, including air sampling filters, in most cases involves using filter digestion with concentrated mineral acids.<sup>3–11</sup> This sample pre-treatment is time consuming and involves some potential drawbacks such as analyte losses and sample contamination, as well as the possibility of systematic errors caused by using strong oxidizing acids. Thus, in order to improve the analytical performance for sample

---

\*Corresponding author. Fax: +34-981-595012. Email: qncayebi@usc.es

preparation of industrial hygiene samples such as air filters, ultrasonic metal extraction has been shown to be a realistic alternative to traditional sample pre-treatments. Ultrasound-assisted extraction is an effective way of extracting a number of analytes from different types of samples. The influence of extremely high effective temperatures, which result in increased solubility and diffusivity, and pressures, which favor penetration and transport, at the interface between the extraction solution subjected to ultrasonic energy and a solid matrix, combined with the oxidative energy of radicals created during sonolysis, results in a high extractive power.<sup>12-13</sup> Thus, this methodology has been applied for discontinuous quantitative extraction of a number of metals from workplace air samples and other analytes in a wide variety of samples.<sup>14-17</sup> Furthermore, in comparison with discontinuous procedures, a flow injection (FI) methodology allows repetitive and dynamic exposure of the sample to the extraction solution under ultrasonic radiation. Thus, this dynamic mode minimizes sonication times, and as the sample is retained within the extraction cell, avoids the centrifugation and filtration steps to separate the liquid phase, which simplifies the process and increases sample throughput, allowing the possibility of a completely automatic analytical process.<sup>18-20</sup> Nevertheless, for the moment, a completely automatic analytical process based on FI and ultrasound assisted extraction (UAE) has not been proposed for the determination of cadmium, lead and nickel in air.

As many variables are involved throughout the acid extraction process, a multivariate optimization by using experimental designs is a powerful tool to optimize this procedure. Generally, multivariate optimization of analytical procedures involves two steps: 1) a preliminary evaluation using a screening design in order to select the variables that have influence on the analytical system, but that does not give the optimum value for each variable; 2) an estimation of the real functional relationship between significant factors and the analytical response (response surface designs), to obtain the optimum values of the variables. Among the different groups of screening designs, Plackett-Burman designs<sup>21</sup> allow us to discover the most significant variables for an analytical system with only a few experiments. In order to obtain the optimum values for each variable involved in the analytical system, central composite designs are the most widely used as response surface designs. These design structures are based on full, or fractional, two-level factorial designs by centre point replication and inclusion of an axial portion.<sup>22</sup> The purpose of the present paper is to develop a fast, simple, and inexpensive method for routine determination of cadmium, lead and nickel in welding fumes. Flame atomic absorption spectrometry (FAAS) has been considered as an appropriate technique for the purpose, because it is fast, easy to use, sufficiently sensitive to detect trace cadmium, lead and nickel concentrations accurately, and available in most analytical laboratories.

## 2. Method

### 2.1. Reagents and chemicals

Ultrapure water of  $18.2 \text{ mS cm}^{-1}$  resistivity, obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA USA) was used for the preparation of the reagents and standards. Hydrochloric acid, nitric acid (Merck, Germany) and  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  cadmium, lead and nickel standards (Merck, Germany) were analytical reagent grade.

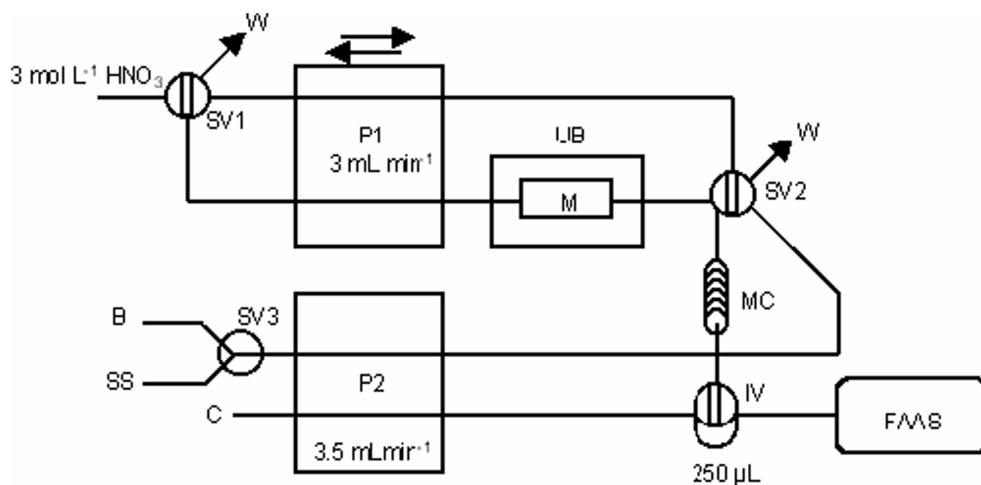


Figure 1. Experimental set-up used for the continuous leaching process and FI determination of cadmium, lead and nickel in welding fumes.

P1 and P2, peristaltic pumps; W, waste; UB, ultrasonic bath; M, minicolumn containing the filter; SS, standard solution; B, blank; IV, injection valve; SV1-SV3, switching valves; MC, mixing coil; C, carrier (ultrapure water) and FAAS, flame atomic absorption spectrometer.

## 2.2. Apparatus

A Perkin Elmer Model 5000 atomic absorption spectrometer (Shelton, CT-USA) fitted with hollow cathode lamps was used. The instrument was set at 228.8, 217.0 and 232.0 nm, for Cd, Pb and Ni, respectively. Signals were measured as peak height. The spectrometer output was connected to a Perkin Elmer Model 50 Servograph Recorder with a range of 5 mV. The FI system (Figure 1) comprises two Gilson Minipuls-3 peristaltic pumps (Gilson, France) fitted with Viton tubes, an ultrasonic cleaner bath (Selecta, Barcelona, Spain) programmable for temperature and time, and with a frequency of 40 kHz, four Rheodyne injection or switching valves (USA), Models 5041 and 5301 and a glass minicolumn (100 mm  $\times$  3 mm i.d., bed volume 700  $\mu$ L) (Omnifit, UK). The ends of the minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541).

Workplace air samples were pumped with a Gilian HFS-513 air-sampling pump with constant high flow of 750 to 5000 mL min<sup>-1</sup> (Sensidyne, USA). Welding fumes were collected on Millipore mixed cellulose ester filters (0.8  $\mu$ m pore size). Each filter is in a polystyrene cassette of 37 mm diameter furnished with a cellulose support.

Statistical analysis of the experimental designs was carried out by means of the Statgraphics Plus V.5.1 statistical package (Manugistic, Inc. Rockville, MD, USA).

## 2.3. Reference method

Open the cassette filter holders and transfer the samples and blanks to clean beakers. Add about 5 mL of concentrated nitric acid, cover the beaker with watch glasses and heated on hotplate (140°C), until the solution is clear. Remove watch glasses and rinse beaker with diluted nitric acid 10% (V/V). Continue heating till semidried (ca. 0.5 mL).

Cool the contents of beaker and diluted 10% nitric acid and transfer the solutions quantitatively to 10 mL volumetric flasks. Subject the solution to a flame atomic absorption spectrometer.

## 2.4. Procedure

Determinations of cadmium, lead and nickel in welding fumes are developed using the approach shown in Figure 1. This dynamic manifold allows the continuous acid extraction of these trace metals and then, their determination by FAAS. The filter is placed within a glass minicolumn (extraction cell of the dynamic UAE system). Then, the extraction cell containing the filter is assembled to the continuous extraction manifold into the ultrasonic bath (preheated to the required temperature, 50, 70 and 80 °C, for Cd, Pb and Ni, respectively). The extraction step starts by pumping 2 mL of 3 mol L<sup>-1</sup> nitric acid. Once loaded the extraction circuit, valve 1 (SV1) is switched to close it. Thus, the continuous extraction system including the extraction unit and the peristaltic pump (P1) became a closed circuit where the acid leaching solution was circulated through the extraction unit at 3 mL min<sup>-1</sup> under ultrasonic irradiation during 1, 2 or 4 min for quantitative extraction of cadmium, lead and nickel, respectively. During this acid extraction step, the direction of the flow is changed every complete circuit cycle in order to avoid compactness of the sample into the minicolumn that could cause overpressure in the flow system. After extraction, SV2 is switched to allow circulation of the acid extract through the mixing coil. Then, the loop of the injection valve (IV) is filled with a total volume of 250 µL of solution, which is injected into an ultrapure water carrier stream that transport it at 3.5 mL min<sup>-1</sup> to the detector.

Standard solutions containing up to 2, 20 and 2 µg mL<sup>-1</sup> for cadmium, lead and nickel, respectively, in the same acid medium as the leaching solution (3 mol L<sup>-1</sup> nitric acid) are introduced into the flow system as shown in Figure 1.

## 3. Results and discussion

Nitric and hydrochloric acids were selected as extraction reagents because they are the most frequently used acids for mineralization, can be obtained in high purity, and lack of the hazards and inconveniences of other acids such as perchloric acid. The main factors affecting the dynamic extraction process were examined. Three factors are related to the acid solution used as leaching solution (two related to its composition : nitric acid concentration and hydrochloric acid concentration, and leaching solution volume), two factors correspond to the ultrasonic stirring (the ultrasonic water-bath temperature and the exposure time to ultrasound) and the flow-rate of the continuous UAE manifold. The effect of changing a factor from a low level to a high level value was examined on a selected response such as percentage extraction efficiency, according to the following equation: % extraction efficiency = (A/B) × 100, where A is the concentration of the metal obtained with the continuous UAE procedure and B the metal concentration obtained with a reference method.<sup>5</sup> The factors and their levels (low and high) are described in Table 1.

### 3.1. Plackett-Burman designs

Plackett-Burman 2<sup>6</sup>\*3/16 type III resolution designs allowing 6 degrees of freedom involved 12 runs plus one centre point were selected for screening purposes. The upper and



Table 1. Ranges over which the variables were studied and their optimum values.

Variable	Key	Low	Upper	Optimum		
				Cd	Pb	Ni
<i>Plackett-Burman 2<sup>6</sup>*3/16 design</i>						
Nitric acid concentration (mol L <sup>-1</sup> )	A	0	3	3	3	3
Hydrochloric acid concentration (mol L <sup>-1</sup> )	B	0	3	0	0	0
Ultrasonic water-bath temperature (°C)	C	20	70	—	—	—
Sonication time (min)	D	0.5	5	—	—	—
Flow-rate of the continuous manifold (mL min <sup>-1</sup> )	E	3	6	3	3	3
Leaching solution volume (mL)	F	2	5	2	2	2
<i>2<sup>2</sup> + star orthogonal central composite design</i>						
Ultrasonic water-bath temperature (°C)	C	30	80	50	70	80
Sonication time (min)	D	3	9	1	2	4

lower values studied for each variable are shown in Table 1, and the results of the design expressed as % extraction efficiency are shown in Table 2. Significant effects for each variable and their interactions were checked by analysis of variance (ANOVA) and using the P-value as significance levels, this value expresses how much the probability of a factor is due to the random errors (Table 3). The conclusions of the screening study were that the factors statistically influential at the 95% confidence level on the continuous extraction were nitric acid concentration for cadmium, lead and nickel, ultrasonic water-bath temperature for lead and nickel, and sonication time only for nickel. However, nitric acid concentration was fixed to 3 mol L<sup>-1</sup> because higher acid concentrations can produce serious damages in the spectrometer nebuliser of FAAS, and using this concentration in one of the runs of the Plackett-Burman designs quantitative % extraction efficiencies were achieved (run 4). On the other hand, the flow-rate of the continuous manifold, acid solution volume and hydrochloric acid concentration and interactions between the variables were not statistically influential at the 95% confidence level within the ranges studied. For all metals, the acid solution volume presents a positive estimated effect, but with low values, and with the aim of increase the analytical sensitivity, the minimum value of this variable was chosen (2 mL). The flow-rate of the continuous manifold has a negative influence on extraction efficiencies, so the minimum value tested (3 mL min<sup>-1</sup>) was selected for subsequent experiments.

### 3.2. Final optimization by central composite designs

Having screened out the variables that did not have a significant effect on the response, the two factors sonication time and ultrasonic water-bath temperature were optimized to provide the maximum metal recovery with the minimum values of these variables. For this, we used an orthogonal central composite design, 2<sup>2</sup> + star with two centre points, resulting in 10 runs with 4 error degrees of freedom. Axial distance ( $\alpha$ ) was selected having a value of 1.07809 in order to establish the orthogonality condition. The results of the design obtained keeping all the other factors at optimum values (Table 1) and expressed as % extraction efficiency are shown in Table 4. These results confirmed that the ultrasonic

Table 2. Design matrix and response values in the Plackett-Burman design ( $2^6 \times 3/16$ ).

Run No.	Key						% extraction efficiency		
	A	B	C	D	E	F	Cd	Pb	Ni
1	+	−	+	−	−	−	77.3	66.7	50.3
2	+	+	−	+	−	−	74.4	65.1	60.7
3	−	+	+	−	+	−	47.6	66.7	12.3
4	+	−	+	+	−	+	97.5	98.7	95.0
5	+	+	−	+	+	−	95.5	89.4	70.5
6	+	+	+	−	+	+	91.2	86.5	70.5
7	0	0	0	0	0	0	96.5	84.1	40.2
8	−	+	+	+	−	+	62.7	71.7	46.4
9	−	−	+	+	+	−	30.1	19.2	0
10	−	−	−	+	+	+	20.2	0	0
11	+	−	−	−	+	+	65.7	61.3	37.3
12	−	+	−	−	−	+	29.5	21.0	0
13	−	−	−	−	−	−	6.1	0	0

+ upper value; − low value; 0 medium value.

Table 3. Estimated effects for each variable and their interactions checked by analysis of variance (ANOVA).

Variable	Cd		Pb		Ni	
	Estimated effects	P-values	Estimated effects	P-values	Estimated effects	P-values
A	54.2083	0.1191	54.1583	0.0911	60.3667	0.0043
B	17.4583	0.4858	20.5083	0.3634	17.4167	0.0481
C	16.5414	0.5061	27.9417	0.2527	22.3833	0.0299
D	17.2083	0.4912	16.1083	0.4560	29.6667	0.0174
E	0.05	0.9961	0.0166667	0.9989	−10.3	0.1760
F	6.38333	0.5434	5.35	0.6610	9.23333	0.2183
A × B	−10.5417	0.6596	−16.2417	0.4528	−5.78333	0.2818
A × C	2.54167	0.9130	−4.50833	0.8214	16.2333	0.0547
A × D	2.60833	0.9108	13.6083	0.5196	12.6167	0.0861
B × C	2.79167	0.8049	15.6417	0.4672	15.8833	0.0570
B × D	−1.19167	0.9591	0.108333	0.9956	7.31667	0.2061
C × D	1.69167	0.9420	2.39167	0.9042	9.73333	0.1334

water-bath temperature and the sonication time were not statistically influential at the 95% confidence level for cadmium extraction in the ranges studied (30–80°C and 3–9 min, for ultrasonic water-bath temperature and the sonication time, respectively). On the other hand, these two variables were statistically influential at the 95% confidence level for lead and nickel extraction. In all the range studied for the sonication time quantitative extraction efficiencies were obtained using a water-bath temperature higher than 30 and 60°C, for Cd and Pb, respectively. In the case of Ni, a quantitative efficiency was obtained if sonication time is longer than 4 min. As interactions between these variables have a positive influence, so that increasing the value of one of them reduces the value of the

Table 4. Design matrix and response values in the central composite design ( $2^2 + \text{star} +$ ).

Run No.	Key		% extraction efficiency		
	C	D	Cd	Pb	Ni
1	0	0	100.0	92.1	94.8
2	28.0478	0	98.7	97.3	100.0
3	81.9522	0	100.0	100.7	79.0
4	—	—	98.7	100.7	79.0
5	0	0	100.0	100.7	87.4
6	0	9.23427	100.0	95.7	89.2
7	—	+	98.7	99.3	71.1
8	+	—	98.7	90.8	79.0
9	+	+	100.0	95.7	73.7
10	0	2.76573	100.0	93.3	58.2

+ upper value; — low value; 0 medium value.

185 other, achieving quantitative extraction efficiencies, and with a goal of increasing sampling frequency, it was proven that it was possible to reduce the sonication time by increasing the water-bath temperature (up to 80°C). Given these findings, we decided to work with the optimum operational conditions given in Table 1.

### 3.3. Optimization of parameters involving the FI system

190 Other flow parameters involving cadmium, lead and nickel determination were also optimized. It was proven that a mixing coil length of about 400 cm achieves a total homogenization of the acid extract, while a longer length would increase the analysis time too much, thus diminishing the sampling frequency. The carrier flow rate and the injected volume were also studied. The carrier flow rate was studied between 3–6 mL min<sup>-1</sup> and the injected volume of the acid solution between 100–400 µL. The aspiration flow-rate of the nebuliser was adjusted to be the same as the flow-rate of the carrier solution. Although a higher aspiration flow-rate provides better sensitivity, a higher dispersion takes place as the carrier flow-rate increases. Therefore, a carrier flow-rate of 3.5 mL min<sup>-1</sup> was chosen as a compromise. With regard to the injected volume it was verified that, as is logical, 195 when the volume was increased the sensitivity was increased. Therefore, a volume of 250 µL was chosen, which in addition, permits the acid extract to be injected several times thereby improving its homogeneity.

### 3.4. Features of the method

205 Calibration graphs were obtained by using peak height as a function of the standard concentrations of cadmium, lead and nickel. Good linearity was obtained up to 3.6 (air volume 135 L), 244.4 (air volume 180 L) and 195.6 (air volume 22.5 L) µg m<sup>-3</sup> for cadmium, lead and nickel, respectively. The standard addition calibration method was used to investigate the effect of the sample matrix on the analyte absorbance. Thus, the slopes of the standard additions and calibration curves were not statistically different 210 (Student's *t*-test, 95% confidence level), proving the absence of matrix interferences.

Table 5. Analysis of air samples, paired *t*-test and % recovery.

Sample	Proposed method			Reference method			% recovery		
	Concentration, expressed as mean $\pm$ standard deviation $\mu\text{g m}^{-3}$ ( $n = 3$ )								
	Cd	Pb	Ni	Cd	Pb	Ni	Cd	Pb	Ni
1	0.5 $\pm$ 0.0	9.7 $\pm$ 0.3	12.4 $\pm$ 1.6	0.5 $\pm$ 0.0	9.9 $\pm$ 1.1	12.9 $\pm$ 1.8	100.0	97.9	96.1
2	1.1 $\pm$ 0.1	29.2 $\pm$ 0.5	62.1 $\pm$ 1.5	1.1 $\pm$ 0.1	30.6 $\pm$ 0.8	65.3 $\pm$ 1.6	100.0	95.4	95.1
3	1.7 $\pm$ 0.1	42.7 $\pm$ 0.8	144.9 $\pm$ 2.2	1.8 $\pm$ 0.1	44.7 $\pm$ 0.8	146.5 $\pm$ 2.9	95.0	95.5	98.9
4	1.3 $\pm$ 0.1	36.1 $\pm$ 0.6	77.3 $\pm$ 1.4	1.3 $\pm$ 0.1	35.9 $\pm$ 0.7	81.5 $\pm$ 1.5	100.0	100.5	95.0
5	1.0 $\pm$ 0.0	10.0 $\pm$ 0.5	46.8 $\pm$ 1.5	1.0 $\pm$ 0.1	10.4 $\pm$ 0.9	46.1 $\pm$ 1.7	100.0	96.2	101.5
6	0.7 $\pm$ 0.0	9.4 $\pm$ 0.4	22.0 $\pm$ 1.7	0.7 $\pm$ 0.0	9.8 $\pm$ 1.1	23.1 $\pm$ 1.8	100.0	95.9	95.2

For Cd: Experimental value of  $t = 1.00$ ; Critical value of  $t$  ( $n - 1 = 5$ ,  $p = 0.05$ ) = 2.57

For Pb: Experimental value of  $t = 2.07$ ; Critical value of  $t$  ( $n - 1 = 5$ ,  $p = 0.05$ ) = 2.57

For Ni: Experimental value of  $t = 2.25$ ; Critical value of  $t$  ( $n - 1 = 5$ ,  $p = 0.05$ ) = 2.57.

The detection limits for the three metals calculated based on three times the standard deviation ( $n = 30$ ) of the blank were 0.1, 0.7 and  $3.4 \mu\text{g m}^{-3}$  for cadmium, lead, and nickel, respectively.

In order to evaluate the precision of the continuous analytical method, the precision was checked for 11 real air samples collected at the same time. Thus, repeatabilities, expressed as relative standard deviation were 3.2% (for a cadmium concentration of  $1.7 \mu\text{g m}^{-3}$ ) 1.9% (for a lead concentration of  $42.7 \mu\text{g m}^{-3}$ ) and 1.6% (for a nickel concentration of  $144.9 \mu\text{g m}^{-3}$ ).

Sample throughputs for cadmium, lead and nickel determinations, taking into account the global process, were ca. 45, 25 and 12 samples per hour, respectively.

### 3.5. Analysis of air samples

The method was applied to determine cadmium, lead and nickel in air samples. Sampling took place in a welding shop and welding fumes were collected during the welding of stainless steel. The results obtained with the proposed method were compared with those achieved by a reference method.<sup>5</sup> To compare the results obtained by both methods, the Paired *t*-Test was applied. As Table 5 shows, both methods do not give significantly different values, thus the agreement between the two methods is satisfactory. Analytical recoveries obtained (shown in Table 5) confirm the accuracy of the proposed procedure.

The concentrations of metals at the workplace investigated, except one for Ni ( $144.9 \mu\text{g m}^{-3}$ ), were below the occupational exposure limit values (VLA) for cadmium, lead and nickel fumes prescribed by Spanish regulations (2, 150 and  $100 \mu\text{g m}^{-3}$ , respectively).

## 4. Conclusions

The proposed methodology offers a rapid and efficient sample preparation method for the direct determination of cadmium, lead and nickel in welding fumes. The method avoids the

use of concentrated mineral acids and conventional acid digestion procedures to dissolve trace metals from the air filter. Furthermore, diluted nitric acid is used and nitrous vapours formation is reduced. The method offers advantages such as low reagent consumption, minimal sample preparation in a short time, resulting in a high sample throughput, which is important in monitoring occupational pollution, and low wastes.

We have extended the use of ultrasound assisted extraction to the leaching of Cd, Pb and Ni as a prior step to their determination at micrograms per cubic meter levels in welding fumes samples by FAAS, which is an available analytical technique in most laboratories. However, the determination of ultra low levels of these metals is achievable if the method is transferred to ETAAS or ICP-MS equipment.

## References

- <sup>1</sup>H. Saito, *et al.*, Ind. Health. **38**, 69 (2000).
- <sup>2</sup>D.M. Tessier and L.E. Pascal, Toxicol. Lett. **167**, 114 (2006).
- <sup>3</sup>Occupational Safety and Health Administration (OSHA), <http://www.osha.gov/dts/sltc/methods>
- <sup>4</sup>National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), <http://www.cdc.gov/niosh/nmam>
- <sup>5</sup>National Institute of Security and Hygiene in the Work (INSHT), [http://www.mtas.es/insht/mta/MA\\_025\\_A92.htm](http://www.mtas.es/insht/mta/MA_025_A92.htm)
- <sup>6</sup>A.M. Paudyn and R.G. Smith, J. Anal. At. Spectrom. **5**, 523 (1990).
- <sup>7</sup>M. Hernández López and A. Arbaizar, At. Spectrosc. **14**, 148 (1993).
- <sup>8</sup>D. Bellido-Milla, *et al.*, J. Anal. At. Spectrom. **12**, 323 (1997).
- <sup>9</sup>A.A. Abdel Hameed and M.I. Khoder, J. Environ. Monitor. **2**, 119 (2000).
- <sup>10</sup>W. Matczak and J. Gromiec, Appl. Occup. Environ. Hyg. **17**, 296 (2002).
- <sup>11</sup>J.D. McNeilly, *et al.*, Toxicol. Lett. **158**, 152 (2005).
- <sup>12</sup>M.D. Luque de Castro and J.L. Luque-García, Trends Anal. Chem. **22**, 41 (2003).
- <sup>13</sup>M.D. Luque de Castro and F. Priego Capote, *Analytical Applications of Ultrasound* (Elsevier, Amsterdam, 2006)
- <sup>14</sup>K. Ashley, Trends Anal. Chem. **17**, 366 (1998).
- <sup>15</sup>N. Jalbani, *et al.*, Talanta. **70**, 307 (2006).
- <sup>16</sup>R.M. De Souza, *et al.*, J. Anal. At. Spectrom. **21**, 1345 (2006).
- <sup>17</sup>D. Santos Júnior, *et al.*, Appl. Spectrosc. Rev. **41**, 305 (2006).
- <sup>18</sup>M.D. Luque de Castro and J.L. Luque-García, *Acceleration and Automation of Solid Sample Treatment* (Elsevier, Amsterdam, 2002).
- <sup>19</sup>M.C. Yebra-Biurrun, S. Cancela-Perez, and A. Moreno-Cid-Barinaga, Anal. Chim. Acta. **51**, 533 (2005).
- <sup>20</sup>M.C. Yebra-Biurrun and S. Cancela-Pérez, Anal. Sci. **23**, 993 (2007).
- <sup>21</sup>R.L. Plackett and J.P. Burman, Biometrika. **33**, 305 (1946).
- <sup>22</sup>W.P. Gardiner and G. Gettinby, *Experimental Design Techniques in Statistical Practice: A Practical Software-Based Approach* (Ellis Horwood, Chichester, 1998).



Artículo V

**APPLICATION OF A FAST AUTOMATIC METHODOLOGY FOR  
DETERMINATION OF COPPER, IRON AND MANGANESE IN  
WELDING FUMES**

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*Journal of Occupational and Environmental Hygiene (enviado)*









Journal of Occupational and Environmental Hygiene

**Application of a Fast Automatic Methodology for Determination of Copper, Iron and Manganese in Welding Fumes**

Journal:	<i>Journal of Occupational &amp; Environmental Hygiene</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Technical Manuscript
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Yebra-Biurrun, M. Carmen; University of Santiago, Analytical Chemistry Cespón-Romero, Rosa; University of Santiago, Analytical Chemistry
Keyword:	flow injection, trace metals , welding fumes, air analysis





## Application of a Fast Automatic Methodology for Determination of Copper, Iron and Manganese in Welding Fumes

R.M. Cespón-Romero, M.C. Yebra-Biurrun

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology. Faculty of Chemistry. University of Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

### Abstract

**Objective** The analysis of solid samples, including air-sampling filters, in most cases involving filter digestion with concentrated mineral acids. This sample pre-treatment is time consuming and involves some potential drawbacks such as analyte losses and sample contamination, as well as the possibility of systematic errors caused by using strong oxidizing acids. Thus, the aim of this work was to improve the analytical performance for sample preparation of industrial hygiene samples such as air filters.

**Methods** A fast automatic flow-injection flame atomic absorption spectrometric method for the determination of copper, iron and manganese in welding fumes has been developed. For this, ultrasonic leaching (UL) in acid media of the metals collected on the air filter metal was developed in an on-line mode and the metals were monitored continuously by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) by using a flow injection (FI) manifold.

**Results** The optimum conditions were found to be 3 mol/l nitric acid as leaching solution, 80 °C leaching temperature, a sonication time of 3 min, and a flow-rate of the continuous manifold of 3 ml/min. With the established conditions,

copper, iron and manganese were determined in the concentration range of 3.1-244.4, 59.3-3666.7 and 7.5-293.3  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , with a detection limit of 0.9, 17.8 and 2.3  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , and a relative standard deviation in the range of 0.8-4.1, 0.4-1.9 and 0.8-2.5%, respectively, for copper, iron and manganese determination.

**Conclusion** The developed method is simple, inexpensive and precise, and has been shown to be a realistic alternative to traditional sample pre-treatments for hygiene samples as air filters.

**Keywords:** Welding fumes, Trace metals determination

### Introduction

Welders are exposed to fumes and gases such as ozone,  $\text{NO}_x$  and metal oxides generated from the welding processes. The most frequently described respiratory illness among welders is metal fume fever, which is an acute, systemic, febrile illness caused by inhalation of high concentration of metal oxides (Korczynski 2000; Yu et al. 2000; McNeilly et al. 2004; Schaller et al. 2007). In addition, condensed vapors of manganese stand out as putative causes of occupational asthma (Pascal and Tessier 2004). These health hazards require

not only a worker protection, but also the need of a regular monitoring of copper, iron and manganese levels in the workplace environment. Thus, these metals have been determined in welding fumes by x-ray photoelectron spectroscopy (Tandon et al. 1985), neutron activation analysis (Haddad and Zikovsky 1985) or x-ray fluorescence spectrometry (Foster 2000). Nevertheless, atomic absorption spectrometry (AAS) and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) are the more employed analytical techniques for metal determination in welding fumes (Matczak and Gromiec 2002; Ellingsen et al. 2006; National Institute of Security and Hygiene in the Work (INSHT)). Recently, inductively coupled plasma-mass spectroscopy was used to assess the occupational exposure to welding fumes (Botta et al. 2006).

Conventional sample preparation methods used in industrial hygiene samples pre-treatment for analysis of metals by spectroscopic techniques require large amounts of concentrated acids (Wang et al. 2000). These methods are not only slow, but also aggressive to the environment and present unsafe conditions for the analyst because nitrous fumes, highly carcinogenic, are commonly formed during these procedures. In addition, analyte losses by volatilization can occur. In this sense, nowadays the development of rapid, efficient, safety, inexpensive and environmentally acceptable alternatives for sample preparation techniques is an important challenge for analytical chemists. In this context, the use of ultrasonic energy is of great help in

the pre-treatment of solid samples because facilitates and accelerates operations such as the extraction of organic and inorganic compounds, slurry dispersion, homogenization, and other analytical stages. It also eliminates total sample matrix introduction into the nebulizer of the spectrometer, which occurs with solid sampling, slurry sampling, and the digestion procedures (Luque de Castro and Priego Capote 2006). However, ultrasonic leaching (UL) has been only developed in a discontinuous mode to extract trace metals from air filters (Hazelwood et al. 2004). Continuous UL approaches carried out making use of flow injection (FI) manifolds increase the advantages of the discontinuous procedures because avoid random errors associated to glassware calibration, minimize sonication times, decrease reagent consumption, remove the centrifugation and filtration steps to separate the liquid phase, which simplify the process and increase the sample throughput, and allow the possibility of complete automatization of the analytical process (Priego-Capote and Luque de Castro 2004; Yebra-Biurrun et al. 2005).

In the present work, a continuous UL procedure using diluted nitric acid and involving a FI manifold for copper, iron and manganese determination in welding fumes is developed. So far, UL was not used to determine Cu, Fe and Mn in air filters. Flame atomic absorption spectrometry (FAAS) was used for continuous quantification of the analytes after extraction.

## **Materials and methods**

### *Instrumentation*

Copper, iron and manganese were analyzed by FAAS using a Perkin Elmer Model 5000 atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer, Shelton, CT-USA) fitted with hollow cathode lamps and with oxidizing air-acetylene flame. The working conditions for the determination of Cu, Fe and Mn are shown in Table 1. Signals were measured as peak height. The spectrometer output was connected to a Perkin Elmer Model 50 Servograph Recorder with a range of 5 mV. The flow injection system (Figure 1) comprises Gilson Minipuls-3 peristaltic pumps (Gilson, France) fitted with Viton tubes, an ultrasonic bath (Selecta, Barcelona, Spain), four Rheodyne injection or switching valves (USA), Models 5041 and 5301 and a glass minicolumn (100 mm x 3 mm i.d., bed volume 700 µl) (Omnifit, UK); with the ends plugged with filter paper (Whatman 541).

#### *Chemicals and standard solutions*

All chemicals were of analytical grade. Hydrochloric acid, nitric acid (Merck, Germany) and 1000 µg/ml copper, iron and manganese standard solutions (Merck, Germany) were analytical reagent grade. Ultrapure water of 18.2 Mohm cm resistivity, obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA USA) was used for the preparation of the reagents and standards.

#### *Air sampling conditions*

Workplace air samples were pumped with a Gilian HFS-513 air-sampling pump with constant high flow of 750 to 5000 ml/min (Sensidyne, USA). Welding fumes were collected on Millipore (Bedford, USA) mixed cellulose ester filters (0.8 µm pore size). Each

filter is in a polystyrene cassette of 37 mm diameter furnished with a cellulose support.

#### *Procedure for copper, iron and manganese determination in welding fumes*

The filter was placed into a glass minicolumn (extraction cell of the dynamic UL system). This extraction cell was assembled to the continuous approach (Fig. 1). Then, the extraction cell was immersed into the ultrasonic bath at 80 °C, and filled with the leaching solution (2 ml of 3 mol/l nitric acid) impelled by the peristaltic pump. The leaching solution was then circulated through the extraction cell during 3 min under ultrasonic irradiation at 3 ml/min. During the extraction step, the direction of the leaching solution stream was changed each 30 s, to prevent compactness of the filter in the extraction cell, which could cause overpressure in the FI system. After the extraction step, the SV2 is switched to its other position, and the extracted metals were circulated through the mixing coil where the acid solution was homogenized. Then, the loop of the injection valve (IV) was filled with a total volume of 250 µl of the acid extract solution, which was injected into an ultrapure water carrier stream that transport it at 3.5 ml/min to the detector.

## **Results and discussion**

A multivariate optimization approach was used for the continuous leaching step. Statistical analyses were carried out by means of the Statgraphics Plus V.5.1 statistical package (Manugistic, Inc. Rockville, MD, USA). The variables optimized in this step were the sonication time, nature and concentration of the acid solution used as leaching solution (nitric

and hydrochloric acid concentrations), leaching temperature, flow-rate of the continuous manifold and leaching solution volume (Table 2). A Plackett-Burman  $2^6 \times 3/16$  design allowing six degrees of freedom and involving 12 randomized runs plus one center point was built for a screening study of the behavior of the main factors affecting the continuous leaching process. The conclusions of this screening study were that the sonication time, flow-rate of the continuous manifold, leaching solution volume and hydrochloric acid concentration were variables not statistically influential at the 95% confidence level in the ranges studied. However, the results showed better recovery with the minimum value tested for the flow rate of the continuous manifold (3 ml/min), and with the high values tested for sonication time (5 min) and hydrochloric acid concentration (3 ml/min). Though hydrochloric acid concentration has a positive influence, a run of the experimental designs achieved quantitative a % recovery with the minimum value for this variable (0 mol/l). Thus, this minimum value was selected for subsequent experiments. For all metals, the leaching solution volume presents a positive estimated effect, but with low values, and with the aim of increase the analytical sensitivity, the minimum value of this variable was chosen (2 ml). Likewise, the nitric acid concentration and the leaching temperature were statistically influential factors at the 95% confidence level for the continuous extraction of the target analytes. However, nitric acid concentration was fixed to 3 mol/l because higher acid concentrations can produce serious damages in the spectrometer nebulizer of

FAAS. Furthermore, it was proven that this concentration provides a quantitative % recovery for Cu, Fe and Mn (98.7, 97.3 and 96.4 %, respectively). Due to the Plackett-Burman design only provides the tendencies to the optimum, a new factorial design was performed in order to fine tune the sonication time and the leaching temperature to obtain a quantitative % recovery with the minimum values of these variables. For this, we used an orthogonal central composite design,  $2^2$  + star with two center points, resulting in 10 non-randomized runs with 4 error degrees of freedom. Axial distance ( $\alpha$ ) was selected having a value of 1.07809 in order to establish the orthogonality condition. These experiments were performed keeping all the other factors at values according to previous factorial screening design: nitric concentration 3 mol/l, hydrochloric acid concentration 0 mol/l, dissolving solution volume 5 ml and flow-rate of the continuous manifold 3 ml/min. The results obtained confirmed that the leaching temperature and the sonication time were statistically influential factors at the 95% confidence level in the ranges studied (30-80 °C and 3-9 min, for leaching temperature and the sonication time, respectively). Thus, for the variable sonication time in the range studied, when a leaching temperature upper than 70 °C was used, quantitative recoveries (>95%) were obtained. Given these findings, in order to increase the sampling frequency, we decided to work with the optimum operational conditions given in Table 2 under the optimum values heading.

Other flow parameters involving copper, iron and manganese determination were also

optimized. Thus, it was verified that with a mixing coil length of 400 cm (0.8 mm i.d.) a total homogenization of the acid solution was obtained. Nevertheless, longer lengths would increase too much the analysis time, diminishing the sampling frequency. The carrier flow rate and the injected volume were also studied. The carrier flow rate was studied between 3-6 ml/min, and the injected volume of the acid solution between 100-400  $\mu$ l. The aspiration flow-rate of the nebulizer was adjusted to be the same as the flow-rate of the carrier solution. Although the highest aspiration flow-rate provides the best sensitivity, at the same time a high dispersion takes place because has increased the carrier flow-rate. Therefore, a carrier flow-rate of 3.5 ml/min was chosen as a compromise to obtain the minimum dispersion in the flow system. With regard to the injected volume, it was verified that, when the volume was increased the sensitivity was increased. Therefore, a volume of 250  $\mu$ l was chosen, which in addition, allows to inject several times the acid solution verifying its homogeneity.

#### *Characteristics of the method*

As can be seen in Table 1, calibration curves ( $n=7$ ) were obtained by using a linear plot of the peak height as a function of the standard concentrations of each metal, with correlation coefficients ( $r^2$ ) in all cases near to 1 (0.9998 to 0.9999).

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for the three metals, calculated as the mass of analyte which gives a signal that is three times and ten times, respectively, the standard deviation ( $n=30$ ) of

the blank (3 mol/l nitric acid) and taking into account a sampling time of 30, 2 and 10 min for Cu, Fe and Mn, respectively, are shown in Table 1.

The linear relationship between the absorbance signal and Cu, Fe and Mn concentrations (for a sampling time of 30, 2 and 10 min for Cu, Fe and Mn, respectively) and the precision of the continuous analytical method (checked for eleven real air samples collected at the same time), expressed as relative standard deviation also are shown in Table 1.

The sample throughput of the method, taking into account the global process, was ca. 18 samples per hour.

#### *Determination of copper, iron and manganese in welding fumes*

The proposed method was compared in terms of efficiency with a reference method (INSHT) for each metal determination. Table 1 shows the analytical recovery for each metal. In all cases the analytical recovery was better than 95%, which confirms the accuracy of the proposed procedure.

The concentrations of Cu, Fe and Mn at the workplace investigated (up to 96.3, 3002.5 and 194.0  $\mu$ g/m<sup>3</sup>, for Cu, Fe and Mn, respectively) were far below the occupational exposure limit values (VLA) for copper, iron and manganese fumes prescribed by Spanish regulations (200, 5000 and 200  $\mu$ g/m<sup>3</sup>, respectively).

#### **Conclusion**

A fast and simple method for the determination of copper, iron and manganese in welding fumes is proposed. This is the first time that the ultrasonic energy has been used for

accelerating the extraction of these metals from air filters. The method is simple, inexpensive and precise, and is clearly advantageous over those involving intensive treatments, since accurate results can be achieved with minimal sample preparation in a short time, resulting in a high sample throughput, which is important in monitoring occupational pollution. Furthermore, the procedure is safer than acid digestion because corrosive concentrated acids are not used, and also avoiding their toxic vapors, which is an important contribution to a clean analytical chemistry .

## References

- Botta C, Iarmarcovai G, Chaspoul F, Sari-Minodier I, Pompili J, Orsiere T, Berge-LeFranc JL, Botta A, Gallice P, De Meo M (2006) Assessment of occupational exposure to welding fumes by inductively coupled plasma-mass spectroscopy and by the alkaline comet assay. *Environ Molecular Mutagen* 47: 284-295
- Ellingsen DG, Dubeikovskaya L, Dahl K, Chashchin M, Chashchin V, Zibarev E, Tomasen Y (2006) Air exposure assessment and biological monitoring of manganese and other major welding fume components in welders. *J Environ Monitor* 8: 1078-1086
- Foster RD (2000), Sputnik-generated multi-element aerosol-on-filter standards for XRF measurement of harmful elements in workplace air. *X-Ray Spectrom* 29: 467-674
- Haddad E, Zikovsky LJ (1985) Determination of Al, As, Cr, Cs, Fe, Mn, Sb, Sc, W and Zn in the workroom air by instrumental neutron activation analysis. *Radioanal Nucl Chem* 93: 371-378
- Hazelwood K, Drake P, Ashley K, Marcy (2004) Field method for the determination of insoluble or total hexavalent chromium in workplace air. *J Occup Environ Hyg* 1: 613-619
- INSHT. National Institute of Security and Hygiene in the Work. [http://www.mtas.es/insht/mta/MA\\_025\\_A92.htm](http://www.mtas.es/insht/mta/MA_025_A92.htm)
- Korczynski R (2000) Occupational health concerns in the welding industry. *Appl Occup Environ Hyg* 15: 936-945
- Luque de Castro MD, Priego Capote F (2006) Analytical applications of ultrasound, Elsevier, Amsterdam
- Matczak W, Gromiec J (2002) Evaluation of occupational exposure to toxic metals released in the process of aluminum welding. *Appl Occup Environ Hyg* 17: 296-303
- McNeilly JD, Heal MR, Beverland IJ, Howe A, Gibson MD, Hibbs LR, MacNee W, Donaldson K (2004) Soluble transition metals cause the pro-inflammatory effects of welding fumes in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 196: 95-107
- Pascal LE, Tessier DM (2004) Cytotoxicity of chromium(VI) and manganese to lung epithelial cells in vitro. *Toxicol Lett* 147: 143-151
- Priego-Capote F, Luque de Castro MD (2004) Dynamic ultrasound-assisted leaching of essential macro and micronutrient metal elements from animal feeds prior to flame



- atomic absorption spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 378: 1376-1381
- Schaller KH, Csanady G, Filser J, Juengert B, Drexler H (2007) Elimination kinetics of metals after an accidental exposure to welding fumes. *Int Arch Occup Environ Health* 80: 635-641
- Tandon RK, Payling R, Chenhall BE, Crisp PT, Ellis J, Baker RS (1985) Application of X ray photoelectron spectroscopy to the analysis of stainlesssteel welding aerosols: Application de la spectrométrie de photoélectrons aux aérosols de soudage de l'acier inoxydable. *Appl Surface Sci* 20: 527-537
- Wang J, Siegel PD, Lewis DM, Vo E, Wallace WE, Ashley K, Stettler LE (2000) Spectroscopic techniques in industrial hygiene, in Meyers RA (Ed), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester
- Yebra-Biurrun MC, Cancela-Perez S, Moreno-Cid-Barinaga A (2005) Coupling continuous ultrasound-assisted extraction, preconcentration and flame atomic absorption spectrometric detection for the determination of cadmium and lead in mussel samples. *Anal Chim Acta* 533: 51-56
- Yu IJ, Kim KJ, Chang HK, Song KS, Han KT, Han JH, Maeng SH, Chung YH, Park SH, Chung KH, Han JS, Chung HK (2000) Pattern of deposition of stainless steel welding fume particles inhaled into the respiratory systems of Sprague-Dawley rats exposed to a novel welding fume generating system. *Toxicol Lett* 116: 103-111

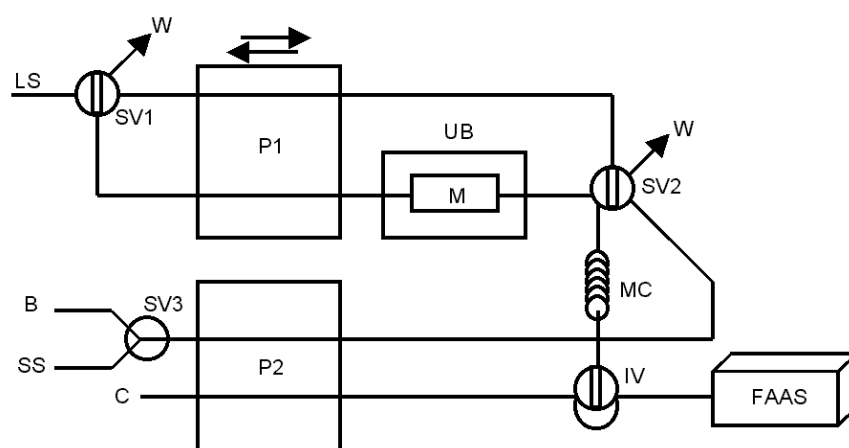


Fig. 1. Experimental set-up used for the continuous leaching process and FI determination of copper, iron and manganese in welding fumes. P1 and P2, peristaltic pumps; LS, leaching solution; W, waste; UB, ultrasonic bath; M, minicolumn containing the filter; SS, standard solution; B, blank; IV, injection valve; SV1-SV3, switching valves; MC, mixing coil; C, carrier (ultrapure water) and FAAS, flame atomic absorption spectrometer

Table 1. Instrumental parameters values and analytical features of the method for the determination of Cu, Fe and Mn in welding fumes by FAAS

Instrumental parameters			
	Copper	Iron	Manganese
Wavelength (nm)	324.8	248.3	279.5
Slit (nm)	0.7	0.2	0.2
Lamp current intensity (mA)	9	27	27
Analytical features of the method			
Calibration plot	$A=1.305 \times 10^{-3}C+0.0002$	$A=6.75 \times 10^{-5}C+0.001$	$A=5.325 \times 10^{-4}C+0.0007$
$r^2$	0.9999	0.9998	0.9998
LOD ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	0.9	17.8	2.3
LOQ ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	3.1	59.3	7.5
Linear range ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	3.1-244.4	59.3-3666,7	7.5-293.3
Relative standard deviation (%)	0.8-4-1	0.4-1.9	0.8-2.5
Recovery (%)	98.3	102.2	97.1

A, absorbance signal

C, concentration expressed as  $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Table 2. Ranges over which the variables were studied and their optimum values

Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$ design			
Variable	Low	Upper	Optimum
Nitric acid concentration (mol/l)	0	3	3
Hydrochloric acid concentration (mol/l)	0	3	0
Sonication time (min)	0.5	5	-
Leaching temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	20	70	-
Flow-rate of the continuous manifold (ml/min)	3	6	3
Dissolving solution volume (ml)	2	5	2
$2^2 + \text{star}$ orthogonal central composite design			
Variable	Low	Upper	Optimum
Sonication time (min)	3	9	3
Leaching temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	30	80	80

Artículo VI

**DETERMINATION OF TRACE METALS IN URINE WITH AN ON-  
LINE ULTRASOUND-ASSISTED DIGESTION SYSTEM  
COMBINED WITH A FLOW-INJECTION PRECONCENTRATION  
SYSTEM COUPLED TO FLAME ATOMIC ABSORPTION  
SPECTROMETRY**

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*Analytica Chimica Acta* (enviado)





available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aca](http://www.elsevier.com/locate/aca)

# Determination of trace metals in urine with an on-line ultrasound-assisted digestion system combined with a flow-injection preconcentration manifold coupled to flame atomic absorption spectrometry

R.M. Cespón-Romero, M.C. Yebra-Biurrun\*

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 5 December 2007

Accepted 2 January 2008

Published on line 8 January 2008

### Keywords:

Metals

Urine

Flow injection

Flame atomic absorption spectrometry

## ABSTRACT

A flow analysis method with on-line sample digestion/minicolumn preconcentration/flame atomic absorption spectrometry is described for the determination of trace metals in urine. First, urine sample was on-line ultrasound-assisted digested exploiting the stopped-flow mode, and then the metals were preconcentrated passing the pre-treated sample through a minicolumn containing a chelating resin. A home-made minicolumn of commercially available iminodiacetic functional group resin, Chelite Che was used to preconcentrate trace metals (Cu, Fe, Mn and Ni) from urine. The proposed procedure allowed the determination of the metals with detection limits of 0.5, 1.1, 0.8 and  $0.8 \mu\text{g L}^{-1}$ , for Cu, Fe, Mn and Ni, respectively. The precision based on replicate analysis was less than  $\pm 10.0\%$ , and the enrichment factor obtained was between 21.3 (Mn) and 44.1 (Ni), for sample volumes between 2.5 and 5.0 mL, and an eluent volume of 110  $\mu\text{L}$ . This procedure was applied for determination of metals in urine of workers exposed to welding fumes and urine of unexposed persons (urine control).

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The analysis of biologic fluids is one of the most appropriate forms of evaluating environmental exposure to pollutants such as toxic metals. Metals are important constituents widely used in different industrial processes, and can be present in biological fluids, namely urine, as consequence of occupational exposure. Generally, urine can be considered for evaluation of such pollutants because is easily sampled and is an important clinical screening procedure to assess the possible influence of workplace exposure on workers such as welders [1,2]. Although atomic absorption spectrometric techniques, used either in the flame or graphite furnace mode

(FAAS and GFAAS) are a powerful analytical tool for the determination of trace metals, the determination of trace metal ions in urine samples is still difficult due to various factors, particularly low metal content and high salt content of the sample matrix [3–5]. The use of a separation technique in the analytical process can solve these problems and lead to easy determination of trace metals in urine samples. There are many methods for preconcentration and/or separation of trace heavy metals from urine samples, but analytical flow-injection (FI) procedures involving a minicolumn containing a chelating resin have been shown to be efficient and effective in enhancing the sensitivity and selectivity of atomic spectroscopic techniques for the determination of trace metals

\* Corresponding author. Tel.: +34 981563100; fax: +34 981595012.

E-mail address: [qncayebi@usc.es](mailto:qncayebi@usc.es) (M.C. Yebra-Biurrun).

0003-2670/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.aca.2008.01.002

[6–10]. In these procedures, an urine pre-treatment is mandatory previous trace metal preconcentration to destroy the organic matter and decompose organic metallic compounds. Microwave digestion is particularly suited for preparation of urine samples [9,11]. Nevertheless, a new, safe and fast urine pre-treatment was recently proposed. This procedure was based on an ultrasound-assisted digestion with oxidant reagents (a mixture of 1:1 (v/v) concentrated hydrochloric acid and hydrogen peroxide) at room temperature [12]. However, this urine sample pre-treatment is carried out in an off-line mode.

In this work, an analytical method was developed with the aim to simplify the traditional off-line methodologies applied up to date to determine metals in urine by FAAS. Trace metals can be determined by an on-line methodology using a fast acid digestion of urine samples based on ultrasound energy in stopped-flow mode coupled to a FI preconcentration manifold, which allows the continuous monitoring of the target analytes by FAAS. Thus, the proposed procedure combines the demonstrated benefits of on-line methodologies involving ultrasound and FI preconcentration by using a chelating resin to increase the sensitivity of one of the most attractive approaches for trace metals analysis because of its relatively low operational costs, easy operation, and high sample throughput as FAAS [13–18].

## 2. Experimental

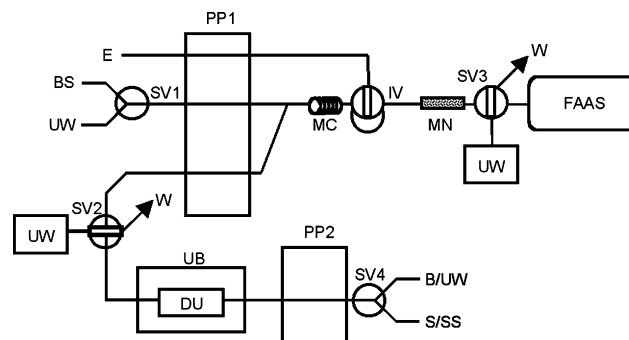
### 2.1. Chemicals, reagents and samples

All chemicals used were of analytical reagent grade and solutions (reagents and standards) were prepared using ultrapure water of 18.2 MΩ cm resistivity, obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). All metal stock solutions (1000 µg mL<sup>-1</sup>) were purchased from Merck (Germany). The working solutions were prepared by series dilution of the stock solutions immediately prior to use. The nitric acid used to digest urine samples and the hydrochloric acid used to elute the metals from the chelating resin were from Merck. The chelating resin for trace metal preconcentration was Chelate Che (Serva Electrophoresis, Germany) with iminodiacetic functional groups. The ammonium acetate (Merck) buffer solution (12 mol L<sup>-1</sup>) was purified by passing it through a Chelate Che minicolumn.

The urine of from workers exposed to welding fumes and from healthy unexposed volunteers was collected in polyethylene vessels. The urine specimens were filtered through a 0.45 µm Millipore membrane filter. Concentrated nitric acid was added to the samples to result a 4 mol L<sup>-1</sup> nitric acid medium. The samples were stored in a refrigerator (~4 °C) for no longer than 2 weeks.

### 2.2. FI apparatus

The on-line system used is schematically depicted in Fig. 1. The manifold was equipped with two Gilson Minipuls-3 peristaltic pumps (Gilson, France) fitted with Viton tubes, one injection valve and four switching valves (Rheodyne, USA), an ultrasonic bath (Selecta, Spain), a glass minicolumn



**Fig. 1 – Continuous manifold for total trace metals determination in urine samples.** B: blank; BS: 12 mol L<sup>-1</sup> ammonium acetate (buffer solution); DU: digestion unit; E: eluent (3 mol L<sup>-1</sup> HCl); FAAS: flame atomic absorption spectrometer; IV: injection valve; MC: mixing coil; MN: minicolumn containing the chelating resin (Chelate Che); PP1 and PP2: peristaltic pumps; S/SS: sample or standard solution (4 mol L<sup>-1</sup> nitric acid medium); SV1, SV2, SV3 and SV4: switching valves; UB: ultrasonic bath; UW: ultrapure water; W: waste.

(100 mm × 15 mm i.d., bed volume 12 mL, Omnifit, UK) used as digestion unit, and Omnifit PTFE tubes (0.8 mm i.d.), and fitting and connectors. The laboratory-made minicolumn for the on-line preconcentration step was prepared filling Viton tubes (100 mm × 1 mm i.d.) with 50 mg of Chelate Che chelating resin (20 mesh). For continuous FAAS monitoring of trace metals, a PerkinElmer Model 5000 air-acetylene flame atomic absorption spectrometer attached to a PerkinElmer Model 50 Servograph Recorder with a range of 5 mV was used.

All glassware were decontaminated with 10% (v/v) nitric acid for at least 48 h and washed three times with Milli-Q water before use.

Statistical analysis of the experimental designs was carried out by means of the Statgraphics Plus V.5.1 statistical package (Manugistic, Inc., Rockville, MD, USA).

### 2.3. Operating procedure for the complete manifold

Table 1 illustrates the operation sequence for the proposed FI system shown in Fig. 1. In a first step is carried out the urine sample digestion. Thus, the urine sample (2.5 mL for Fe and Mn, and 5 mL for Cu and Ni determination) in 4 mol L<sup>-1</sup> nitric acid medium is inserted into the flow system at 7 mL min<sup>-1</sup> by means of a peristaltic pump (PP2). Once all the sample volume is located in the digestion unit (DU), which is immersed in the ultrasonic bath at room temperature, the pump controlling the sample stream (PP2) was stopped for a period of 3 min and the sample stays under the action of ultrasound energy. After, the selecting valve (SV2) was switched to its other position to select the digestion unit downstream (digested sample stream), and pump PP2 was again activated. In this way, the digested sample arrives at the part of the FI system where the preconcentration step takes place. For this, the digested sample stream converged with the buffer stream (12 mol L<sup>-1</sup> ammonium acetate) in order to obtain the optimum pH value for metal retention in the chelating resin. Both

**Table 1 – Operation sequence of the on-line manifold for the determination of metals in urine samples**

Operation/Step	Selected channel by the switching valve				Action of the device		
	SV1 <sup>a</sup>	SV2 <sup>a</sup>	SV3 <sup>a</sup>	SV4 <sup>a</sup>	IV <sup>b</sup>	PP1 <sup>c</sup>	PP2 <sup>c</sup>
Sample introduction	UW <sup>d</sup>	UW <sup>d</sup>	UW <sup>d</sup>	S/SS <sup>e</sup>	Load	On	On
Sample digestion	UW <sup>d</sup>	UW <sup>d</sup>	UW <sup>d</sup>	–	Load	On	Stop
Preconcentration	BS <sup>f</sup>	DU <sup>g</sup>	UW <sup>d</sup>	–	Load	On	Stop
Elution/detection	UW <sup>d</sup>	UW <sup>d</sup>	MN <sup>h</sup>	–	Inject	On	On
Washing	UW <sup>d</sup>	UW <sup>d</sup>	UW <sup>d</sup>	UW <sup>d</sup>	Load	On	On

<sup>a</sup> SV1, SV2, SV3 and SV4: switching valves.

<sup>b</sup> IV: injection valve.

<sup>c</sup> PP1 and PP2: peristaltic pumps.

<sup>d</sup> UW: ultrapure water.

<sup>e</sup> S/SS: sample or standard solution.

<sup>f</sup> BS: buffer solution.

<sup>g</sup> DU: digestion unit downstream.

<sup>h</sup> MN: minicolumn downstream.

channels are homogenised in the mixing coil and then, the resulting stream passed through the minicolumn containing the chelating resin (Chelite Che). By means of SV3, the sample matrix is sent to waste, while ultrapure water flowing through the detector by the nebulizer suction. Finally, the retained metals were subsequently eluted by injection of a volume of 110  $\mu\text{L}$  of 3 mol  $\text{L}^{-1}$  hydrochloric acid into a water carried stream, being continuously monitored by a FAAS instrument.

In order to avoid carry-over, a washing step was including in the analysis cycle. Thus, between each sample analysis, the digestion unit was washed with ultrapure water during 30 s. For this, the selecting valve (SV4) was switched to select the ultrapure water stream channel, while the wash water was sent to waste through SV2.

### 3. Results and discussion

The order used to optimise the steps involved in the overall method was as follows: first, the FI preconcentration step, which is necessary to increase the sensitivity to be able to detect the metals at concentrations usually found in urine samples, and finally, the variables affecting the on-line digestion of urine sample. Multivariate optimisation approaches were used to optimise the FI preconcentration step involving a minicolumn packed with a chelating resin and the digestion step to decompose the urine sample.

#### 3.1. Optimisation of the FI preconcentration step

To determine the optimum values of the variables involving the preconcentration step, a study of these variables was performed for a synthetic urine matrix prepared by dissolving 17 g NaCl, 2.6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 3.8 g KCl, 2.38 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.72 g  $\text{CaCl}_2$  and 1.16 g  $\text{MgCl}_2$  in 2.7 L of ultrapure water [19]. This synthetic urine was spiked with Cu, Fe, Mn and Ni (resulting concentration 50, 100, 50 and 40  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively), and was added concentrated nitric acid to result a 5 mol  $\text{L}^{-1}$  nitric acid medium. Chelite Che was selected as chelating resin, based on the good results reported in the literature for trace metals preconcentration in resins with iminodiacetic functional groups [20,21]. A Plackett-Burman  $27^*3/32$  factorial design

with 12 runs plus 1 centerpoint was developed in order to determine the influence of the variables involving the preconcentration step. The chosen factors and their minimum and maximum levels are shown in Table 2. The factorial design was evaluated using the recovery as analytical response and are shown in Pareto charts (Table 3 and Fig. 2). The results demonstrated that for all metals, the concentration of the ammonium acetate buffer channel is the only significant factor (with positive sign). The results of this screening design demonstrated that the variables in the studied levels need a final optimisation. In accordance with the recovery results: the preconcentration system is more efficient using the factor buffer channel flow-rate with the high level tested, while the mixing coil length and elution flow-rate do not affect the metal recoveries. Thus, these three factors were fixed at 2.0  $\text{mL min}^{-1}$ , 100 cm and 4.0  $\text{mL min}^{-1}$ , respectively. The other four factors (concentration of the buffer channel, sample flow-rate, and eluent volume and concentration) were optimised using an orthogonal central composite design,  $24^+$  star with 2 centerpoints, resulting in 26 randomised runs (Table 4). Axial distance ( $\alpha$ ) was selected having a value of 1.48258 in order to establish the orthogonality condition. These experiments were performed keeping all the other factors at values according to previous factorial screening design as described above. The results obtained confirmed that the concentration of the buffer, sample flow-rate, and eluent concentration were statistically influential factors at the 95% confidence level in the ranges studied. Ammonium acetate buffer concentration and eluent concentration with positive sign and sample flow-rate with negative sign. While eluent volume is not a significant factor at the range studied. Given these findings, we decided to work with the optimum operational conditions given in Table 2 under the optimum values heading. In these conditions it was proven that 110  $\mu\text{L}$  of eluent are enough to elute quantitatively all retained metals. Thus, this eluent volume was chosen as optimum for further experiments.

#### 3.2. Optimisation of the on-line digestion step

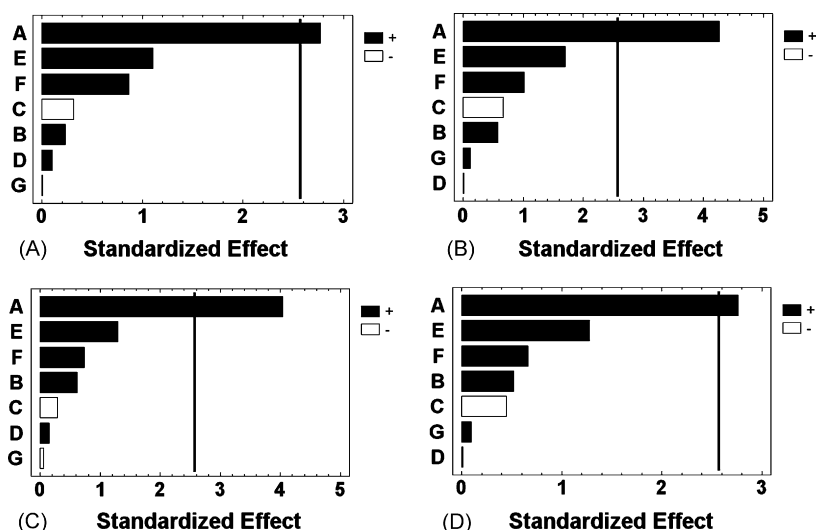
Three factors were selected and studied at two levels: sonication time (stopped-flow time), digestion temperature and

**Table 2 – Ranges over which the variables were studied and their optimum values for optimisation of the FI preconcentration step**

Variable	Key	Low	Upper	Optimum			
				Cu	Fe	Mn	Ni
Plackett-Burman 27*3/32 design							
Concentration of the ammonium acetate buffer channel (mol L <sup>-1</sup> )	A	0	12	–	–	–	–
Buffer channel flow-rate (mL min <sup>-1</sup> )	B	0.5	2	2	2	2	2
Sample flow-rate (mL min <sup>-1</sup> )	C	0.5	4	–	–	–	–
Mixing coil length (cm)	D	100	300	100	100	100	100
Eluent: hydrochloric acid							
Volume (μL)	E	90	190	–	–	–	–
Concentration (mol L <sup>-1</sup> )	F	0.1	3	–	–	–	–
Elution flow-rate (mL min <sup>-1</sup> )	G	2	4	4	4	4	4
24̂+ star orthogonal central composite design							
Concentration of the ammonium acetate buffer channel (mol L <sup>-1</sup> )	A	10	12	12	12	12	12
Sample flow-rate (mL min <sup>-1</sup> )	C	2	3	2	2	2	2
Eluent volume (μL)	E	110	190	110	110	110	110
Eluent concentration (mol L <sup>-1</sup> )	F	1	3	3	3	3	3

**Table 3 – Optimisation of the FI preconcentration step: design matrix and response values in the Plackett-Burman design ( $27^3/32$ )**

Run no.	Key							Recovery (%)			
	A	B	C	D	E	F	G	Cu	Fe	Mn	Ni
1	12	0.5	4	100	90	0.1	4	5.9	12.4	21.3	7.5
2	12	2	0.5	300	90	0.1	2	20.3	32.7	35.7	24.7
3	0	2	4	100	190	0.1	2	0	0	0	0
4	12	0.5	4	300	90	3	2	50.5	50.5	58.6	40.3
5	12	2	0.5	300	190	0.1	4	61.4	76.2	82.1	70.2
6	12	2	4	100	190	3	2	56.6	71.5	78.0	65.0
7	6	1.25	2.25	200	140	1.55	3	71.0	60.6	71.1	77.7
8	0	2	4	300	90	3	4	0	0	0	0
9	0	0.5	4	300	190	0.1	4	0	0	0	0
10	0	0.5	0.5	300	190	3	2	0	0	0	0
11	12	0.5	0.5	100	190	3	4	60.5	74.8	64.3	61.4
12	0	2	0.5	100	90	3	4	0	0	0	0
13	0	0.5	0.5	100	90	0.1	2	0	0	0	0

**Fig. 2 – Pareto charts for Plackett-Burman design ( $27^3/32$ ) for optimisation of the FI preconcentration step: (A) Cu; (B) Fe; (C) Mn; (D) Ni.**



**Table 4 – Optimisation of the FI preconcentration step: design matrix and response values in the central composite design 2<sup>4</sup> + star**

Run no.	Key				Recovery (%)			
	A	C	E	F	Cu	Fe	Mn	Ni
1	11	2.5	150	2	71.9	68.5	54.7	72.8
2	10	2	110	1	64.1	64.2	60.1	65.2
3	12	2	110	1	82.5	81.9	77.7	82.8
4	10	3	110	1	55.3	54.9	40.7	43.0
5	12	3	110	1	61.9	60.7	46.5	51.6
6	10	2	190	1	58.9	57.1	52.9	58.0
7	12	2	190	1	83.6	81.9	77.7	84.8
8	10	3	190	1	58.9	54.9	40.7	45.8
9	12	3	190	1	66.1	70.0	55.9	61.0
10	10	2	110	3	85.1	84.2	81.4	80.5
11	12	2	110	3	101.0	99.8	98.6	101.5
12	10	3	110	3	75.7	74.6	60.1	65.2
13	12	3	110	3	86.9	85.7	71.5	76.6
14	10	2	190	3	77.1	81.9	77.7	82.8
15	12	2	190	3	99.7	101.2	100.3	100.1
16	10	3	190	3	64.4	69.5	58.3	63.4
17	12	3	190	3	77.1	81.9	67.7	76.6
18	9.51742	2.5	150	2	68.8	70.0	60.1	65.2
19	12.4826	2.5	150	2	83.6	87.0	77.7	82.8
20	11	1.75871	150	2	70.0	81.9	81.4	86.5
21	11	3.24129	150	2	52.5	60.7	50.5	55.6
22	11	2.5	90.6969	2	56.7	64.0	60.1	55.6
23	11	2.5	209.303	2	75.5	74.6	65.3	72.8
24	11	2.5	150	0.517421	28.8	35.1	25.7	30.3
25	11	2.5	150	3.48258	86.9	87.0	77.7	82.8
26	11	2.5	150	2	75.5	74.6	65.3	70.4

**Table 5 – Optimisation of the on-line digestion step: ranges over which the variables were studied, their optimum values and design matrix with response values in the central composite design 2<sup>3</sup> + star**

Variable	Key	Low	Upper	Optimum			
				Cu	Fe	Mn	Ni
2 <sup>3</sup> + star orthogonal central composite design							
Digestion temperature (°C)	H	20	70	20	20	20	20
Sonication time (min)	I	1	5	3	3	3	3
Nitric acid concentration (mol L <sup>-1</sup> )	J	1	4	4	4	4	4
Run no.			Recovery (%)				
	H	I	J	Cu	Fe	Mn	Ni
1	45	3	2.5	75.5	72.4	78.9	79.9
2	20	1	1	68.3	58.2	70.8	63.5
3	70	1	1	68.3	62.0	70.8	66.8
4	20	5	1	68.3	66.3	68.3	71.1
5	70	5	1	68.3	77.5	78.9	79.9
6	20	1	4	72.5	75.1	78.9	85.2
7	70	1	4	68.3	68.0	78.9	73.7
8	20	5	4	101.7	104.4	101.7	103.0
9	70	5	4	97.9	99.5	98.9	100.1
10	12.8203	3	2.5	68.3	77.5	66.5	79.9
11	77.1797	3	2.5	75.5	77.5	70.8	85.2
12	45	0.425623	2.5	68.3	60.0	68.3	66.8
13	45	5.57438	2.5	75.5	77.5	86.1	79.9
14	45	3	0.569217	68.3	68.0	66.5	73.7
15	45	3	4.43078	97.9	99.5	98.9	100.1
16	45	3	2.5	80.6	87.8	89.8	88.8

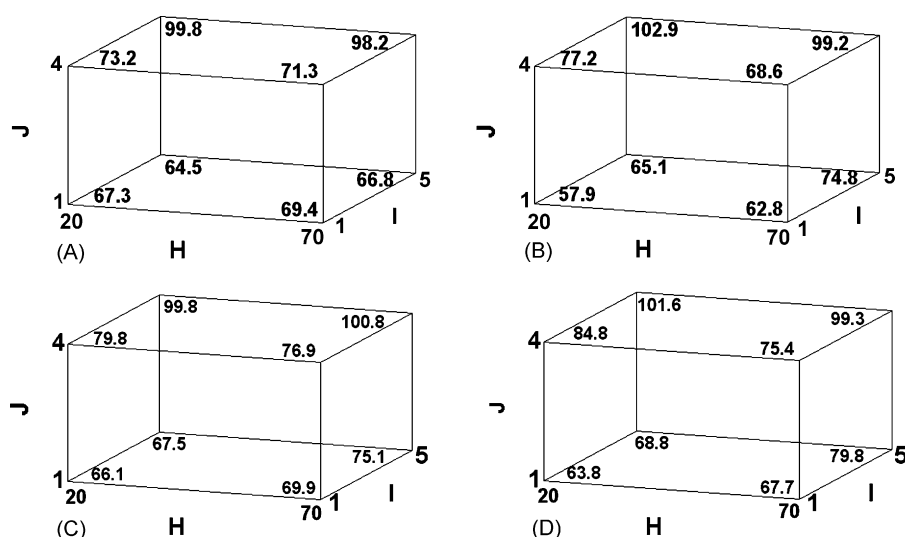


Fig. 3 – Cubic response surfaces for the central composite design  $2^3 + \text{star}$  for optimisation of the on-line digestion step: (A) Cu; (B) Fe; (C) Mn; (D) Ni.

nitric acid concentration for the acid sample medium. The effects of these effects were simultaneously investigated using a  $2^3 + \text{star}$  central composite orthogonal experimental factorial design with 2 centerpoints. The low and high levels defined for the variables and the design matrix are shown in Table 5. The axial distance value ( $\alpha$ ) between the centre of the design and the star points was 1.28719. This optimisation was developed by using an urine sample spiked with Cu ( $25 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Fe ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Mn ( $40 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and Ni ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Response (% recovery) was calculated against a classical off-line procedure involving urine sample digestion with nitric acid [22]. The conclusions of this study were that sonication time and nitric acid concentration exceeded the level of statistical significance (95%) and the digestion temperature remained below the statistically significant level (95%) in the range under study. Fig. 3 shows the cubic response surfaces for this design. In light of the above results, it was decided to fix the upper values studied for significant factors (Table 5). With regard to digestion temperature, room temperature ( $20^\circ\text{C}$ ) was selected as optimum for subsequent experiments because it has a very small estimated effect.

### 3.3. Analytical figures of merit

Calibration curves for each metal were plotted using standard solutions. The equations of the calibration plots, the correlation coefficients, the linear range and the detection limit for each trace metal are summarized in Table 6. The sampling frequency for the complete procedure and pre-concentration factors (calculated by the ratio of the slopes of the calibration curves obtained with and without pre-concentration using FAAS) achieved for each trace metal were also shown in Table 2. The precision, expressed as relative standard deviation ( $n=11$ ) for analytes are between 0.5–3.5% for Cu (concentration range  $5.7\text{--}44.9 \mu\text{g L}^{-1}$ ), 0.5–0.9% for Fe (concentration range  $59.4\text{--}181.8 \mu\text{g L}^{-1}$ ), 0.6–3.7% for Mn (concentration range  $3.3\text{--}20.4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and 2.5–7.5% for Ni (concentration range  $3.1\text{--}20.2 \mu\text{g L}^{-1}$ ). In order to estimate the accuracy of the proposed procedure, first was tested the accuracy of the FI pre-concentration system. For this, a certified reference material was used (BCR184, Bovine muscle, Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium, with certified concentrations of  $2.36 \pm 0.06 \mu\text{g g}^{-1}$  for Cu,  $79 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$

Table 6 – Analytical features of the method for the determination of Cu, Fe, Mn and Ni in urine by FAAS

Analyte	Calibration plot <sup>a</sup>	$r^{2b}$	LOD <sup>c</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Linear range ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Sample volume (mL)	PF <sup>d</sup>	SF <sup>e</sup> (samples $\text{h}^{-1}$ )	Recovery (%)
Cu	$A = 2.6 \times 10^{-3}C + 3 \times 10^{-4}$	0.999	0.5	1.5–117.4	5.0	42.6	9	104.0
Fe	$A = 1.1 \times 10^{-3}C + 2 \times 10^{-4}$	0.999	1.1	3.7–230.4	2.5	21.7	12	97.5
Mn	$A = 1.6 \times 10^{-3}C + 3 \times 10^{-4}$	0.999	0.8	2.5–93.9	2.5	21.3	12	96.8
Ni	$A = 1.5 \times 10^{-3}C + 5 \times 10^{-4}$	0.999	0.8	2.6–45.4	5.0	44.1	9	99.1

<sup>a</sup> A, absorbance signal; C, concentration expressed as  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

<sup>b</sup> Correlation coefficient.

<sup>c</sup> R.S.D., relative standard deviation.

<sup>d</sup> PF, pre-concentration factor.

<sup>e</sup> SF, sampling frequency.

**Table 7 – Determination of trace metals in urine samples using the proposed methodology**

Urine samples	Concentration expressed as mean $\pm$ S.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ( $n=3$ )							
	Proposed method				Reference method <sup>a</sup>			
	Cu	Fe	Mn	Ni	Cu	Fe	Mn	Ni
Workers exposed to welding fumes								
Urine 1	39.5 $\pm$ 0.5	179.2 $\pm$ 0.8	19.2 $\pm$ 0.2	15.7 $\pm$ 0.4	38.3 $\pm$ 0.6	182.6 $\pm$ 1.4	19.9 $\pm$ 0.4	15.8 $\pm$ 0.5
Urine 2	28.0 $\pm$ 0.4	126.7 $\pm$ 0.5	15.8 $\pm$ 0.3	10.5 $\pm$ 0.3	26.5 $\pm$ 0.5	128.3 $\pm$ 0.9	15.9 $\pm$ 0.5	10.7 $\pm$ 0.4
Urine 3	21.1 $\pm$ 0.3	181.8 $\pm$ 1.0	12.1 $\pm$ 0.3	16.9 $\pm$ 0.0	21.9 $\pm$ 0.4	179.4 $\pm$ 1.5	12.4 $\pm$ 0.4	16.8 $\pm$ 0.3
Urine 4	44.9 $\pm$ 0.6	127.0 $\pm$ 0.7	20.4 $\pm$ 0.1	20.2 $\pm$ 0.4	44.4 $\pm$ 0.7	131.5 $\pm$ 1.1	20.5 $\pm$ 0.3	20.7 $\pm$ 0.5
Urine 5	14.7 $\pm$ 0.2	129.0 $\pm$ 0.8	4.6 $\pm$ 0.3	8.5 $\pm$ 0.3	15.0 $\pm$ 0.3	127.6 $\pm$ 1.2	4.8 $\pm$ 0.4	8.4 $\pm$ 0.4
Urine 6	20.1 $\pm$ 0.1	89.7 $\pm$ 0.5	12.7 $\pm$ 0.3	7.5 $\pm$ 0.3	19.3 $\pm$ 0.2	93.2 $\pm$ 1.3	13.2 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.4
Non-exposed persons (urine control)								
Urine 7	8.0 $\pm$ 0.3	129.0 $\pm$ 0.8	5.4 $\pm$ 0.2	5.6 $\pm$ 0.3	7.8 $\pm$ 0.4	128.3 $\pm$ 1.4	5.3 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 0.4
Urine 8	10.7 $\pm$ 0.3	140.6 $\pm$ 0.5	<LOD	<LOD	11.0 $\pm$ 0.4	138.4 $\pm$ 1.4	–	–
Urine 9	5.7 $\pm$ 0.2	59.4 $\pm$ 0.5	4.8 $\pm$ 0.3	<LOD	5.5 $\pm$ 0.3	61.9 $\pm$ 1.5	4.6 $\pm$ 0.4	–
Urine 10	14.7 $\pm$ 0.3	70.6 $\pm$ 0.5	3.3 $\pm$ 0.0	3.1 $\pm$ 0.3	14.9 $\pm$ 0.4	73.8 $\pm$ 1.3	3.3 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.4
Urine 11	7.8 $\pm$ 0.3	127.0 $\pm$ 0.7	<LOD	3.8 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.4	126.7 $\pm$ 1.2	–	3.7 $\pm$ 0.3
Urine 12	5.7 $\pm$ 0.2	109.7 $\pm$ 0.6	<LOD	<LOD	6.0 $\pm$ 0.3	108.4 $\pm$ 1.3	–	–
Experimental value of t	1.11	1.20	1.86	1.55				
Critical value of t ( $n-1=11$ , $P=0.05$ ) = 2.20; critical value of t ( $n-1=8$ , $P=0.05$ ) = 2.30.								
<sup>a</sup> Conventional off-line sample digestion method with concentrated nitric acid [22], on-line trace metal preconcentration by using the previously optimised FI system involving Chelate Che chelating resin and determination by FAAS.								

for Fe and  $334 \pm 28 \text{ ng g}^{-1}$  for Mn, and an indicative concentration for Ni of  $270 \text{ ng g}^{-1}$ ). The concentration obtained (mean  $\pm$  S.D.,  $n=3$ ) were  $2.36 \pm 0.12$ ,  $79.4 \pm 1.3$ ,  $323.0 \pm 18.2$  and  $274.1 \pm 12.8 \mu\text{g g}^{-1}$  for Cu, Fe, Mn and Ni, respectively, which agrees with the certified and indicative values. Then, to determine the accuracy of the global procedure, the results obtained with the proposed method were compared with those achieved when the urine samples were digested by a conventional procedure with nitric acid [22]. To compare the results obtained by both methods, the Paired t-test was applied. As shown in Table 7, both methods do not give significantly different values, thus the agreement between the two methods is satisfactory. Analytical recoveries obtained (shown in Table 6) were quantitative in all cases when samples were spiked with  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  of each studied metal, which also confirms the accuracy of the proposed procedure.

### 3.4. Application to real urine samples

The slopes of the method of standard additions for urine samples were found in good agreement with the slopes of the conventional calibration (t-test, 95% confidence level), which indicated that there is not a matrix effect and demonstrates the adequacy of the proposed procedure for the FI determination of trace metals in urine samples.

Based on above findings, the procedure was applied to the determination of Cu, Fe, Mn and Ni in urine samples. The results obtained were summarised in Table 7. As can be seen in Table 7, in general, metal concentrations found in urine samples of workers exposed to welding fumes were higher than those obtained for non-exposed persons (urine control). These results demonstrate the applicability of the presented procedure for copper, iron, manganese and nickel determination in urine samples. The concentrations achieved for these metals in urine samples agree well with others data reported

in the literature for workers exposed to welding fumes and non-exposed persons (urine control) [23,24].

## 4. Conclusions

The proposed procedure constitutes the first application of the on-line ultrasound-assisted acid digestion methodology based on a stopped-flow mode for urine samples preparation to the determination of trace metals. The method allows sample digestion, preconcentration and detection to be carried out in a single FI manifold. This methodology can be developed by partial or total automated analytical approaches, which greatly speeds-up sample throughput.

As evidenced from the data we have presented, our proposed method is a simple and rapid procedure for precisely and accurately determining trace metals in urine. Therefore, simplifies the traditional off-line methodologies applied up to date to determine metals in these samples by FAAS.

## REFERENCES

- [1] H.I. Afridi, T.G. Kazi, M.K. Jamali, G.H. Kazi, M.B. Arain, N. Jalbani, G.Q. Shar, R.A. Sarfaraz, Toxicol. Ind. Health 22 (2006) 381.
- [2] I.C. Stridsklev, K.H. Schaller, S. Langard, Int. Arch. Occup. Environ. Health 80 (2007) 450.
- [3] M.T. Siles Cordero, E.I. Vereda Alonso, A. Garcia de Torres, J.M. Cano Pavón, J. Anal. At. Spectrom. 19 (2004) 398.
- [4] A.N. Anthemidis, G.A. Zachariadis, J.S. Stratis, J. Anal. At. Spectrom. 18 (2003) 1400.
- [5] A.P. Dos Anjos, L. Cornejo-Ponce, S. Cadore, N. Baccan, Talanta 71 (2007) 1252.
- [6] E. Hosten, B. Welz, Anal. Chim. Acta 392 (1999) 55.
- [7] A.N. Anthemidis, G.A. Zachariadis, J.A. Stratis, Talanta 60 (2003) 929.

- [8] Y.H. Sung, S.D. Huang, *Anal. Chim. Acta* 495 (2003) 165.
- [9] M. Burguera, J.L. Burguera, D. Rivas, C. Rondon, P. Carrero, O.M. Alarcon, Y. Petit de Peña, M.R. Brunetto, M. Gallignani, O.P. Marquez, J. Marquez, *Talanta* 68 (2005) 219.
- [10] S. Dadfarnia, A.M.H. Shabani, A.A. Jafari, Z. Saadat, F. Tamaddon, *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.* 51 (2006) 302.
- [11] I. Narin, M. Soylak, *Anal. Chim. Acta* 493 (2003) 205.
- [12] R.A.A. Muñoz, F.S. Felix, M.A. Augelli, T. Pavesi, L. Angnes, *Anal. Chim. Acta* 571 (2006) 93.
- [13] M.D. Luque de Castro, F. Priego Capote, *Analytical Applications of Ultrasound*, Elsevier, Amsterdam, 2006.
- [14] A. Caballo-Lopez, M.D. Luque de Castro, *Talanta* 71 (2007) 2074.
- [15] M.D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, *Anal. Chim. Acta* 583 (2007) 2.
- [16] A. Moreno-Cid, M.C. Yebra, *Spectrochim. Acta B* 57 (2002) 967.
- [17] M.C. Yebra-Biurrun, R.M. Cespón-Romero, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 711.
- [18] M.C. Yebra-Biurrun, S. Cancela-Pérez, *Anal. Sci.* 23 (2007) 993.
- [19] T. Aydemir, S. Gucer, *Anal. Lett.* 29 (1996) 351.
- [20] M. Soylak, *Anal. Lett.* 37 (2004) 1203.
- [21] K.C. Bowles, S.C. Apte, G.E. Batley, L.T. Hales, N.J. Rogers, *Anal. Chim. Acta* 558 (2006) 237.
- [22] C.J.C. Maciel, G.M. Miranda, D. Palma de Oliveira, M.E.P.B. De Siquiera, J.N. Silveira, E.M.A. Leite, J.B. Borba Da Silva, *Anal. Chim. Acta* 491 (2003) 231.
- [23] C.H. Horng, J.L. Tsai, P.H. Horng, S.C. Lin, S.R. Lin, C.C. Tzeng, *Talanta* 56 (2002) 1109.
- [24] S. Saracoglu, M. Soylak, L. Elci, *Talanta* 59 (2003) 287.

Artículo VII

**DETERMINATION OF HEXAVALENT CHROMIUM IN WELDING  
FUMES BY FLOW INJECTION FLAME ATOMIC ABSORPTION  
SPECTROMETRY AFTER DYNAMIC ALKALINE ULTRASOUND-  
ASSISTED EXTRACTION/ANION EXCHANGE  
PRECONCENTRATION**

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*Atomic Spectroscopy* (enviado)





# Determination of Hexavalent Chromium in Welding Fumes by Flow Injection Flame Atomic Absorption Spectrometry After Dynamic Alkaline Ultrasound-assisted Extraction/Anion Exchange Preconcentration

\*M.C. Yebra and R.M. Cespon

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology,  
Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela,  
15782-Santiago de Compostela, Spain

## INTRODUCTION

Interest and demand for hexavalent chromium determination in air from workplace environments has increased because it is toxic and carcinogenic even at very low levels. High concentration of Cr(VI) in the workplace occurs during work activities such as stainless steel welding, thermal cutting, chrome plating, painting, and coating processes (1). The Occupational Safety and Health Administration (OSHA) has proposed a permissible exposure limit (PEL) of 0.005 mg of Cr(VI) per cubic meter of workplace air (2). Therefore, to protect the health of exposed workers it is necessary to determine Cr(VI) in workplace air using fast and reliable analytical procedures in order to verify that the concentration of this element does not rise above the permissible value.

Analysis of Cr(VI) in industrial hygiene samples generally requires two major steps: extraction from a filter and detection. An optimal extraction procedure should completely extract Cr(VI) species without disturbing the species distribution (3–4). That is, there should be not reduction of Cr(VI) and no oxidation of Cr(III). The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) and OSHA recommended alkaline buffer extraction of air filters for hexavalent chromium determina-

## ABSTRACT

A fast and simple method for the fully automatic determination of Cr(VI) in welding fumes by flame atomic absorption spectrometry is presented. This method is based on a dynamic alkaline ultrasound-assisted extraction coupled on-line to a flow-injection preconcentration minicolumn system. The minicolumn was filled with an anionic exchange resin (Dowex 1-X8), which increased the analytical sensitivity of the proposed method 12.7 times. Under the optimum conditions, using 10% (v/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ –2% (v/v)  $\text{NaHCO}_3$  as the extractant solution at a flow rate of 6  $\text{mL min}^{-1}$ , 40 °C and 5 minutes as the extraction temperature and sonication time, respectively, a retention flow rate of 2.5  $\text{mL min}^{-1}$ , 150  $\mu\text{L}$  of eluent (0.5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ –0.1 M  $\text{NH}_3$ ), and an elution flow rate of 3.5  $\text{mL min}^{-1}$ , a precision of 2% (expressed as the relative standard deviation) and a sampling frequency of 10 samples per hour were obtained. The proposed method was successfully applied to the analysis of Cr(VI) in welders' workplace environments.

tion in workplace atmospheres and in airborne hexavalent chromium determination with the aim of stabilize Cr(VI) and prevent air oxidation of Cr(III) (2). In this sense, several methodologies have been proposed involving alkaline buffers for extracting and dissolving Cr(VI) species from hygienic samples based on the use of ultrasonic

energy to accelerate the extraction step. Thus, Wang et al. (5–6) used an ammonium buffer; Ndung'u et al. (7) an ammonium and a phosphate buffer; and Sabty-Daily et al. (8), Scancar et al. (9), and Hazelwood et al. (10) used a carbonate buffer. In these procedures, between 15–30 minutes and a room temperature of 70 °C as the extraction conditions were employed. However, these approaches are based on an off-line extraction and full automation of the method herewith described has to our knowledge not yet been proposed.

Measurement of extracted Cr(VI) from workplace samples is generally accomplished by spectrophotometry by using its selective reaction with 1,5-diphenylcarbazine (DPC) (11–15). Nevertheless, under proper acidic conditions the ligand reacts little with other transition metals. Therefore, solid-phase extraction is usually used to isolate Cr(VI) from Cr(III) and other metal cations. Atomic absorption spectrometry (AAS) was also an analytical technique used to determine Cr(VI) because it is simple, rapid, and readily available. In these methodologies, separation of Cr(VI) is ordinarily required because Cr(III) might also be present, and analytical sensitivity is approved (16–18). In this sense, anion-exchange resins or membranes were successfully applied for chromium speciation (5,19–21).

The present paper describes a fully automated procedure based

\*Corresponding author.  
E-mail: qncayebi@usc.es  
Fax: 34981595012



on coupling dynamic alkaline ultrasound-assisted extraction, minicolumn separation, and a flame atomic absorption spectrometric (FAAS) detection of Cr(VI) in welding fumes collected on polyvinyl chloride (PVC) filters through a flow injection (FI) manifold interface. The developed method has been applied to the determination of Cr(VI) in welders' workplace environments.

## EXPERIMENTAL

### Instrumentation

A PerkinElmer Model 5000 atomic absorption spectrometer furnished with a chromium hollow-cathode lamp was used (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA). The instrument was set at 357.9 nm. An acetylene flow rate of 4.5 L min<sup>-1</sup> and an air flow rate of 15.0 L min<sup>-1</sup> were employed to obtain a clear yellow flame (reducing). The spectrometer output was connected to a Perkin Elmer 50 servograph recorder with a range of 5 mV. The signals measured were the heights of the absorbance peaks. The FI system (Figure 1) comprises two Gilson® Minipuls™-3 peristaltic pumps (Gilson, France), an ultrasonic bath (Selecta, Spain), four Rheodyne® injection or switching valves (USA), Models 5041 and 5301, and a glass minicolumn (100 mm x 3 mm i.d., bed volume 700 µL) (Omnifit, UK) with the ends plugged with filter paper (Whatman 541) used as the extraction unit. The laboratory-made minicolumn for the on-line preconcentration step was prepared by filling Tygon® tubes (100 x 1.1 mm i.d.) with 50 mg of Dowex 1-X8 resin (20 mesh).

All glassware and plasticware was decontaminated with 10% (v/v) nitric acid for at least 48 h and washed three times with Milli-Q™ water before use.

Statistical analysis of the experimental designs was carried out by means of the Statgraphics Plus V.5.1 statistical package (Manugistic, Inc. Rockville, MD, USA).

### Reagents

Ultrapure water of 18.3 MΩ cm resistivity obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) was used for the preparation of reagents and standards. All chemical products are of analytical-reagent grade. Cr(VI) and Cr(III) working standard solutions were prepared from 1000 µg mL<sup>-1</sup> stock standard solutions prepared by K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> and Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Germany). Diluted standard solutions were freshly prepared before each analysis. Sodium carbonate and sodium bicarbonate (Merck) were used for preparation of 10% (v/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-2% (v/v) NaHCO<sub>3</sub> (pH 11) which we've used as the alkaline extraction solution. Dowex 1-X8 strongly basic anion-exchange resin Cl<sup>-</sup> form (20 mesh) (Sigma, USA) was used to isolate and preconcentrate Cr(VI).

Ammonium sulfate and ammonia (Merck) were used for preparation of a buffer solution 0.5 mol L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-0.1 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> (pH 8.3) which was used as the eluent.

### Evaluation of Sample Homogeneity

Before starting the optimization study of the dynamic alkaline extraction process, the homogeneity of the samples was tested. Six samples were collected at the same workplace site using six filters and six air sampling pumps. The objective was that between sampling, filter variation should not mask the effects of the experimental factors to be optimized. With this aim, a set of six filter samples was collected for Cr(VI) determination during an effective welding time of 400 min at a sampling flow rate of 2.0 L min<sup>-1</sup>. Cr(VI) was captured on PVC filters and analyzed using the NIOSH 7600 method (22). The mean concentration obtained for Cr(VI) was 1.5 µg m<sup>-3</sup> with a relative standard deviation of 3.4%, which is an acceptable value for homogeneous samples (similar in

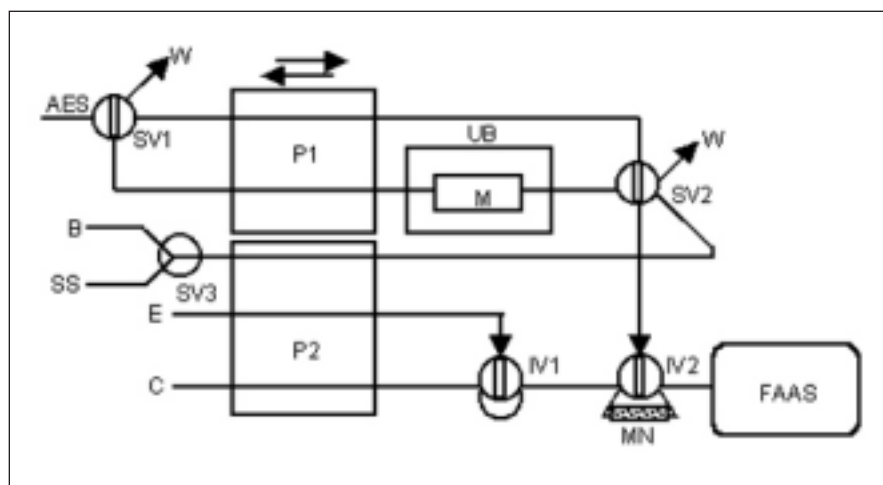


Fig. 1. Experimental set-up used for the dynamic alkaline extraction process and FI preconcentration/determination of Cr(VI) in welding fumes. P1 and P2, peristaltic pumps; AES, alkaline extraction solution [10% (v/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-2% (v/v) NaHCO<sub>3</sub>]; W, waste; UB, ultrasonic bath; M, minicolumn containing the filter; SS, Cr(VI) standard solution; B, blank; IV, injection valve; SV1-SV3, switching valves; IV1 and IV2, injection valves; E, eluent [0.5 mol L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 0.1 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>]; C, carrier (ultrapure water); MN, preconcentration minicolumn packed with the anion-exchange resin Dowex 1-X8 and FAAS, flame atomic absorption spectrometer.



terms of mass and composition) obtained with different pumps at the same time and from the same site.

## Sampling and Procedure

Workplace air samples were pumped with a Gilian HFS-513 air-sampling pump with a constant high flow of 750 to 5000 mL min<sup>-1</sup> (Sensidyne, USA). This pump was calibrated up to an air flow of 2.0 L min<sup>-1</sup> (sampling flow rate). Welding fumes were collected on Millipore (Bedford, USA) polyvinyl chloride (PVC) filters (5.0 µm pore size). Each filter is in a sampling cassette of 37 mm diameter. Sampling took place in a welding shop, and welding fumes were collected during the welding of stainless steel.

Air filters were removed from the sampling cassette and placed into a glass minicolumn (extraction unit of the dynamic alkaline ultrasound-assisted extraction device). This extraction unit was assembled for the dynamic alkaline extraction process (Figure 1). Then, the extraction unit was immersed into the ultrasonic bath at 40 °C, and filled with the extraction solution [2 mL of 10% (v/v) NaHCO<sub>3</sub>-2% (v/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>] impelled by the peristaltic pump. The alkaline extraction solution was then circulated through the extraction unit for 5 minutes under ultrasonic irradiation at 6.0 mL min<sup>-1</sup>. During the extraction step, the direction of the leaching solution stream was changed each 30 seconds to prevent compactness of the filter in the extraction cell, which could cause overpressure in the FI system. After the extraction step, the SV2 was switched to its other position, and the alkaline extract arrived at the part of the FI system where the separation step takes place. Thus, the alkaline extract passed at 2.5 mL min<sup>-1</sup> through the minicolumn placed on the loop of the elution injection valve (IV1) and containing

the anion-exchange resin (Dowex 1-X8). The sample matrix was sent to waste, while ultrapure water flowed through the detector. Finally, Cr(VI) was subsequently eluted at 3.5 mL min<sup>-1</sup> by injection of a 150-µL volume of 0.5 mol L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-0.1 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> into a water carrier stream and continuously monitored by a flame atomic absorption spectrometer.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Optimization of the Preconcentration Step

With the aim of increasing analytical sensitivity, a preconcentration minicolumn was included in the FI manifold. The anion-exchange resin Dowex 1-X8 was selected as a suitable material for the separation of Cr(VI) because of the good results reported in the literature (5,21). According to these references, an ammonium buffer 0.5 mol L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-0.1 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> (pH 8.3) was selected as the eluent.

The main factors that affected the preconcentration process were pH of the sample solution, retention flow rate, elution flow-rate, and the eluent volume. In order to establish the best chemical and FI conditions for retention and elution of the analyte, the procedure was optimized. The pH effect was evaluated for Cr(VI) preconcentration in the resin in the range of 4-12. The results showed that Cr(VI) is retained quantitatively within the range studied. This range includes alkaline pH, which will be the medium of the samples when the preconcentration step is accomplished since it takes place after alkaline extraction. Therefore, adjustment of the alkaline sample extract was not necessary for Cr(VI) retention. The retention flow rate was optimized in the 1-5 mL min<sup>-1</sup> range. It was found that there was a decrease in sensitivity

for flow rates higher than 2.5 mL min<sup>-1</sup>; thus, this flow rate was selected for this study. The effect of the eluent flow rate (carrier stream: ultrapure water) was studied in the 2.0-5.0 mL min<sup>-1</sup> range. An increase in peak height was observed up to a flow rate of 3.5 mL min<sup>-1</sup> which is due to peak broadening at low flow rates. Thus, an elution flow rate of 3.5 mL min<sup>-1</sup> was selected for further studies. The influence of the eluent volume used was also studied, and it was observed that 150 µL of 0.5 mol L<sup>-1</sup> ammonium buffer was sufficient for quantitative elution of Cr(VI).

### Optimization of the Dynamic Ultrasound-assisted Alkaline Extraction of Cr(VI)

To extract the Cr present in the hexavalent state, an alkaline 10% (v/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-2% (v/v) NaHCO<sub>3</sub> buffer solution (pH 11) that had been applied to industrial hygiene samples and for hexavalent chromium determination in workplace atmospheres was adopted (2,9-10). The ultrasound-assisted extraction of Cr(VI) from the filter was carried out using an experimental design approach. The factors selected and their levels are presented in Table I. A factorial screening half-fraction 2<sup>4-1</sup> design, which studied the effects of the four factors in 8 randomized experiments plus one centerpoint was run. The conclusions of this screening study were that in dynamic Cr(VI) alkaline extraction there are two factors statistically significantly affected by a positive sign: extraction temperature and sonication time; that is, these factors overtake the limit of statistical significance (at 95% confidence). The other parameters were not statistically significant, with estimated effects of 6.3 and 0.3 for extraction flow rate and alkaline solution volume used as extractant, respectively. Therefore, as the extraction flow rate is affected by a positive sign, a

value for this variable of 6.0 mL min<sup>-1</sup> was chosen as optimum. With regard to the alkaline solution volume, this variable also is affected by a positive sign. But as can be seen above, it has a small estimated effect, and in order to shorten the analysis time, a 2-mL value for this variable was chosen as optimum for subsequent work. Since the screening design only provides tendencies towards the optimum, a new factorial design was performed in order to fine-tune the extraction temperature and sonication time to obtain a quantitative % recovery with the minimum values of these variables. For this, we used an orthogonal central composite design, 2<sup>2</sup> + star with two center points, resulting in 10 non-randomized runs with 4 error degrees of freedom. Axial distance ( $\alpha$ ) was selected having a value of 1.07809 in order to establish the orthogonality condition. The results obtained confirmed that the sonication time was a statistically influential factor at the 95% confidence level in the range studied (3–5 minutes). While extraction temperature is affected also by a positive sign, it is not statistically significant in the range studied (40–70 °C). Considering Figure 2, which shows the response surface of this design, we decided to con-

sider as optimum the following values for the variables studied: 5 minutes and 40°C for sonication time and extraction temperature, respectively.

#### Determination of Cr(VI) in the Presence of Cr(III)

To estimate the recovery for Cr(VI) in the presence of Cr(III), the alkaline buffer solution used as extractant was spiked before extraction with Cr(III) concentrations between 0.05–0.2 µg mL<sup>-1</sup>. The results show that recoveries for Cr(VI) in spiked samples were between 97.1 and 98.7%. Therefore, the proposed procedure does not disturb the chromium species distribution.

#### Analytical Characteristics

The calibration graph (n=7) was measured with Cr(VI) standard solutions between 0 and 0.35 µg mL<sup>-1</sup> under optimum chemical and flow conditions for the whole process. Thus, the equation was: absorbance =  $1 \times 10^{-4} + 0.661X$  (r=0.999), where X is Cr(VI) concentration expressed as µg mL<sup>-1</sup>. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated from 30 measurements of unexposed air filters and were 1.8 and 6.1 µg L<sup>-1</sup>, respectively. The preconcentration factor of the

method, based on the rate between the calibration graph of the proposed method and the direct graph slopes (without preconcentration), was found to be 12.7. The repeatability (2%) was calculated from 11 analyses of air filters sampled at the same time in a stationary sampling site at a workplace environment by means of the relative standard deviation. The recovery of the method was checked by adding to the alkaline extractant solution 0.1 µg of Cr(VI) and using this solution to develop the determination of Cr(VI) in an air sample by the proposed procedure. The recovery obtained was 97.1%.

A comparison of the slopes of the calibration graph and the standard addition graph using a *t*-test (95% confidence level) was made and no difference was observed, which indicated that there is not a matrix effect (22).

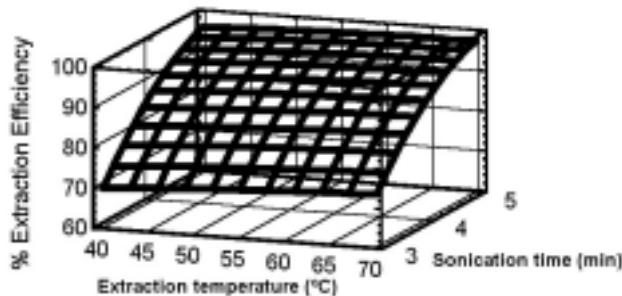
The sample throughput (taking into account the global process) was about 10 samples h<sup>-1</sup>.

#### Application

The continuous system described above was applied to the determination of Cr(VI) in welding fumes from a welding shop during the welding of stainless steel. As can be seen in Table II, the concen-

**TABLE I**  
**Factors and Levels Considered in the Factorial Screening Half-fraction 2<sup>4-1</sup> Design Used to Optimize the Dynamic Ultrasound-assisted Alkaline Extraction of Cr(VI) From the Air Filters**

Factor	Low Level	High Level
Extraction Temperature	20 °C (room temperature)	70 °C
Sonication Time	0.5 min	5 min
Extraction Flow Rate	3 mL min <sup>-1</sup>	6 mL min <sup>-1</sup>
Alkaline Solution Volume Used as Extractant [10% (v/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> –2% (v/v) NaHCO <sub>3</sub> ]	2 mL	5 mL



*Fig. 2. Estimated response surface from the central composite design 2<sup>2</sup> + star applied to optimize the dynamic ultrasound-assisted alkaline extraction of Cr(VI).*

**TABLE II**  
**Determination of Hexavalent Chromium**

Air Samples	Cr(VI) Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ); Mean $\pm$ SD (n=3)	
	Proposed Method	Reference Method (NIOSH 7600)
Sample 1	1.50 $\pm$ 0.03	1.44 $\pm$ 0.07
Sample 2	1.25 $\pm$ 0.02	1.20 $\pm$ 0.06
Sample 3	0.10 $\pm$ 0.00	nd
Sample 4	0.95 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.05
Sample 5	0.26 $\pm$ 0.01	nd
Sample 6	0.24 $\pm$ 0.01	nd
Sample 7	0.85 $\pm$ 0.02	0.90 $\pm$ 0.04

Critical value of  $t$  (n-1 = 3, P=0.05) = 3.18; Experimental value of  $t$ =0.08  
SD = Standard Deviation  
nd = not detected

tration of Cr(VI) obtained was up to  $1.5 \mu\text{g m}^{-3}$ . The results obtained were also compared with those achieved by using the NIOSH 7600 method (23). To compare the results obtained by these two methods, a paired  $t$ -test was applied (24) and both methods do not give significantly different values, thus the agreement between the two methods is satisfactory at a 95% confidence level.

## CONCLUSION

For the first time, the full automation in the determination of Cr(VI) in air samples was accomplished and herewith reported. The proposed methodology is based on a dynamic alkaline ultrasound-assisted extraction manifold coupled to a flow injection (FI) preconcentration-FAAS system. This method was found to be fast, accurate, inexpensive, and simple, and was accomplished with minimum reagent consumption as compared with off-line ultrasound-assisted extraction procedures. The study of method performance demonstrated the benefits of dynamic ultrasound treatment with a quantitative recovery and good sensitivity, achieving a preconcentration factor of 12.7 and a LOD lower than  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$ . The analysis of workplace air sam-

ples demonstrated the validity of the proposed method for the determination of Cr(VI) in welding fumes.

*Received October 8, 2007.*

## REFERENCES

1. J. N. Dennis, M.J. French, P.J. Hewitt, S.B. Mortazavi, and C.A.J. Redding, *Anal. Occup. Hyg.* 46, 43 (2002).
2. Department of Labor Occupational Safety and Health Administration: Safety and Health Topics. Hexavalent Chromium. <http://www.osha.gov/SLTC/hexavalentchromium/index.html>
3. M.J. Marqués, A. Salvador, and A.E. Morales Rubio, *Fresenius J. Anal. Chem.* 362, 239 (1998).
4. K. Ashley, A.M. Howe, M. Demange, and O. Nygren, *J. Environ. Monit.* 5, 707 (2003).
5. J. Wang, K. Ashley, E.R. Kennedy, and C. Neumeister, *Analyst* 122, 1307 (1997).
6. J. Wang, K. Ashley, D. Marlow, E.C. England, and G. Carlton, *Anal. Chem.* 71, 1027 (1999).
7. K. Ndung'u, N. Djane, F. Malmus, and L. Mathiasson, *Analyst* 124, 1367 (1999).
8. R.A. Sabty-Daily, K.K. Luk, and J.R. Froines, *Analyst* 127, 852 (2002).

9. J. Scancar, and R. Milacic, *Analyst* 127, 629 (2002).
10. K. J. Hazelwood, P. Drake, K. Ashley, and D. Marcy, *J. Occup. Environ. Hyg.* 1, 613 (2004).
11. L. Girard, and J. Hubert, *Talanta* 43, 1965 (1996).
12. J. Wang, K. Ashley, D. Marlow, E.C. England, and G. Carlton, *Anal. Chem.* 71, 1027 (1999).
13. G. Samanta, C.B. Boring, and P.K. Dasgupta, *Anal. Chem.* 73, 2034 (2001).
14. E.H. Borai, E.A. El-Sofany, A.S. Abdel-Halim, and A.A. Soliman, *Trends Anal. Chem.* 21, 741 (2002).
15. M. Goldoni, A. Caglieri, D. Poli, M.V. Vettori, M. Corradi, P. Apostoli, and A. Mutti, *Anal. Chim. Acta* 562, 229 (2006).
16. D. Naranjit, Y. Thomassen, and J.C. Van Loon, *Anal. Chim. Acta* 110, 307 (1979).
17. C. Brescianini, A. Mazzucotelli, F. Valerio, R. Frache, and G. Scarponi, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 332, 34 (1988).
18. R. Milacic, J. Scancar, and J. Tusek, *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 549 (2002).
19. G.L. Ou-Yang, and J.F. Jen, *Anal. Chim. Acta* 279, 329 (1993).
20. E. Castillo, M. Granados, and J.L. Cortina, *Anal. Chim. Acta* 464, 15 (2002).
21. A. Aparna, M. Sumithra, G. Venkateswarlu, A.C. Sahayam, S.C. Chaurasia, and T. Mukherjee, *At. Spectrosc.* 27, 123 (2006).
22. M. Blanco, R. Boque, R. Cela, J. Coello, S. Paspocho, M.C. Ortiz, J. Riba, F.X. Rius, A. Ruiz, L.A. Sarrabia, and X. Tomás, *Avances en Quimiometría Práctica, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain* (1994).
23. NIOSH Method 7600. <http://www.cdc.gov/niosh/nmam/pdfs/7600.pdf>
24. J.C. Miller and J.N. Miller, *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Prentice Hall, Madrid, Spain (2002).



Artículo VIII

**FLOW INJECTION DETERMINATION OF TOTAL CHROMIUM IN  
URINE OF OCCUPATIONALLY EXPOSED WORKERS**

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*Microchimica Acta* (aceptado)





*Original Paper*

## Flow injection determination of total chromium in urine of occupationally exposed workers

Rosa María Cespón, María Carmen Yebra

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry,  
University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Received 5 October 2007; Accepted 22 November 2007; Published online 31 January 2008  
© Springer-Verlag 2008

**Abstract.** An efficient and fast method has been developed to determine chromium in urine. It is based on an on-line ultrasound-assisted sample digestion procedure exploiting the stopped-flow mode, followed by flow injection chromium preconcentration using a minicolumn filled with a commercially available chelating resin (Chelite Che). The precision as repeatability (expressed as relative standard deviation,  $n = 11$ ) was 1.4% at a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  level. The recovery, based on analysis of spiked samples and solutions including urine matrix components, is quantitative. The detection limit was  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  when flame atomic absorption spectrometry was employed. The preconcentration factor is 42.6. The method was applied to the determination of chromium in urine of workers exposed to welding fumes.

**Keywords:** Chromium; urine; exposed workers; preconcentration; flow injection; flame atomic absorption spectrometry

Chromium is both an essential and toxic trace element. The more important oxidation states are III (stable, essential trace element) and VI (highly toxic, oxidizing). Nevertheless, when hexavalent chromium

enters into the body, when it is ingested is efficiently reduced to the trivalent form in the gastrointestinal tract, and if it is breathing air, can be reduced in the lungs to the trivalent form by ascorbate and glutathione [1]. As this element has significant industrial and metallurgical uses, the stainless steel welding fume exposure is a very important occupational risk for welders. Blood and urine are currently used for the biologic monitoring of workers exposed to chromium and represent the gold standard matrices for the assessment of metal exposure [2, 3]. Nevertheless, urine is easily sampled and its determination is a suitable test for workers exposed to Cr compounds [4]. Flame atomic absorption spectrometry (FAAS) still continues to be one of the most attractive approaches for trace metals analysis in most laboratories due to its relatively low operational costs, easy operation, and high sample throughput. However, direct FAAS determination of trace amounts of chromium in urine samples is usually difficult owing to its insufficient detection power. Thus, preconcentration procedures involving a minicolumn containing a chelating resin have been shown to be efficient and effective in enhancing the sensitivity of FAAS for chromium determination in urine samples [5, 6]. In these procedures, an urine pretreatment is mandatory previous chromium preconcentration to destroy the organic matter. In this sense, microwave digestion is particularly suited

Correspondence: María Carmen Yebra, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, SP-15782-Santiago de Compostela, Spain, e-mail: qncayebi@usc.es

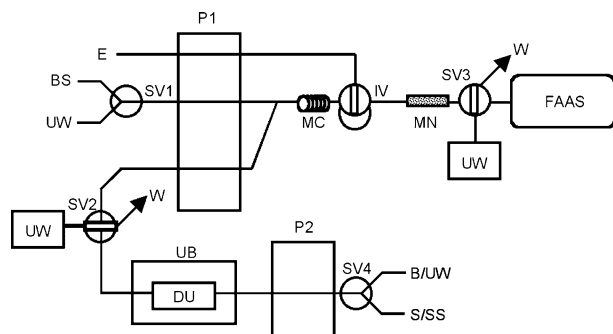
for preparation of urine samples [7]. Although recently, a new, safe and fast sample pretreatment was proposed for urine samples. This involves ultrasound-assisted oxidation with a mixture of 1:1 (v/v) concentrated hydrochloric acid and hydrogen peroxide at room temperature [8]. However, this sample pretreatment is performed in an off-line mode. As our investigation team developed for first time a continuous ultrasound-assisted extraction system coupled to a flame atomic absorption spectrometer improving to its off-line counterpart method [9], we decided also to perform the pretreatment of a liquid sample as urine in an on-line way.

In the present study, an on-line methodology using a fast acid digestion of urine samples based on ultrasound energy and exploiting the stopped-flow mode was coupled to a flow injection (FI) preconcentration manifold to determine chromium by FAAS.

## Experimental

### Instrumentation

A Perkin Elmer Model 5000 air-acetylene flame atomic absorption spectrometer was used for FAAS determination of chromium (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, U.S.A.). The FI system (Fig. 1) used for the on-line urine digestion and chromium preconcentration comprises two Gilson Minipuls-3 peristaltic pumps (Gilson, France) fitted with Viton tubes (Omnifit, U.K.), one injection valve and four switching valves (Rheodyne, U.S.A.), an ultrasonic bath (Selecta, Spain), a glass minicolumn used as digestion unit, (100 mm  $\times$  15 mm i.d., bed volume 12 mL, Omnifit, U.K.) and PTFE tubes (0.8 mm i.d.) (Omnifit, U.K.). The laboratory-made minicolumn for the on-line preconcentration step was prepared filling Viton tubes (100  $\times$  1 mm i.d.) (Omnifit, U.K.) with 50 mg of chelating resin.



**Fig. 1.** Continuous manifold for total chromium determination in urine samples. *B* Blank; *BS* 12 mol L<sup>-1</sup> ammonium acetate (buffer solution); *DU* digestion unit; *E* eluent (3 mol L<sup>-1</sup> HCl); *FAAS* flame atomic absorption spectrometer; *IV* injection valve; *MC* mixing coil; *MN* minicolumn containing the chelating resin (Chelite Che); *P1* and *P2* peristaltic pumps; *S/SS* sample or standard solution (4 mol L<sup>-1</sup> nitric acid medium); *SV1*, *SV2*, *SV3* and *SV4* switching valves; *UB* ultrasonic bath; *UW* ultrapure water; *W* waste

All glassware and plasticware were decontaminated with 10% (v/v) nitric acid (Merck, Germany) for at least 48 h and washed three with Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) before use.

### Reagents and solutions

All reagents were of at least analytical grade. A chromium stock standard solution of 1000  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (Merck, Germany) was used. Working standards solutions were prepared just before use by appropriate dilution of the stock standard solution. The nitric acid used to digest the urine sample and the hydrochloric acid used to elute chromium from the chelating resin were from Merck, Germany. The chelating resin for chromium preconcentration was Chelite Che (Serva Electrophoresis, Germany; 20 mesh) with imminodiacetic functional groups. Ammonium acetate (Merck, Germany) buffer solution (12 mol L<sup>-1</sup>). Ultrapure water of 18.2 M $\Omega$ cm resistivity, obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) was used for the preparation of the reagents and standards.

### Samples and sample treatment

Sampling time is end of shift at the end of the work week. Urine samples were collected in polyethylene vessels. Concentrated nitric acid was added to the samples to result a 4 mol L<sup>-1</sup> nitric acid medium. The samples were stored in a refrigerator ( $\sim$ 4  $^{\circ}$ C) for no longer than 2 weeks.

### Analytical procedure

The FI system used for chromium determination in urine samples is shown in Fig. 1. The urine sample (5 mL) in 4 mol L<sup>-1</sup> nitric acid medium is inserted into the flow system by means of a peristaltic pump (P2). Once all the sample volume arrives to the digestion unit (DU), which is immersed in an ultrasonic bath at room temperature, the peristaltic pump P2 was stopped for a period of 3 min. After, the selecting valve (SV2) was switched to its other position to select the digestion unit downstream channel (digested sample stream) and P2 was again activated. Thus, the digested sample goes to FI preconcentration system, where converged with the buffer stream (12 mol L<sup>-1</sup> ammonium acetate) in order to obtain the optimum pH value for chromium retention in the chelating resin. Both channels are homogenised in the mixing coil and then, the resulting stream passed through the minicolumn containing the chelating resin (Chelite Che). Finally, chromium is eluted by injection of a volume of 110  $\mu$ L of 3 mol L<sup>-1</sup> hydrochloric acid into a water carried stream, which swept it to the FAAS detector where is continuously monitored.

In order to avoid carry-over, a washing step was including in the analysis cycle. Thus, between each sample analysis, the digestion unit was washed with ultrapure water during 30 sec. For this, the selecting valve (SV4) was switched to select the ultrapure water stream channel, while the wash water was sent to waste through SV2.

## Results and discussion

### Optimisation of the preconcentration step

In order to improve the sensitivity of the method, the FI manifold includes a preconcentration minicolumn. Chelite Che and 3 mol L<sup>-1</sup> hydrochloric acid were selected as chelating resin and eluent, respectively,



based on the good results reported in the literature for chromium preconcentration in resins with iminodiacetic functional groups [10–12]. To determine the optimum values of the variables involving the preconcentration step, a study of these variables was performed for a synthetic urine matrix prepared by dissolving 17 g NaCl, 2.6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 3.8 g KCl, 2.38 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.72 g  $\text{CaCl}_2$  and 1.16 g  $\text{MgCl}_2$  in 2.7 L of ultrapure water [13]. This synthetic urine was spiked with chromium (resulting concentration  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  Cr(III)). In order to achieve the optimum pH conditions for Cr(III) retention on the chelating resin, the recovery was examined by using different concentrations for the ammonium acetate buffer channel (between 0 and  $12 \text{ mol L}^{-1}$ ) and different values for its flow rate (between 0.5 and  $2 \text{ mL min}^{-1}$ ). Thus, it had proved that optimum pH for chromium recoveries up to 95% were found if the concentration of ammonium acetate buffer channel is  $12 \text{ mol L}^{-1}$  and its flow rate  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . The sample flow rate was optimised in the range  $0.5\text{--}4 \text{ mL min}^{-1}$  (taking into account that the flow rate of the buffer channel is  $2 \text{ mL min}^{-1}$ ) and the results were that the recovery increased when the flow rate decreased up to  $2 \text{ mL min}^{-1}$ , so a sample flow rate of  $2 \text{ mL min}^{-1}$  to retain Cr(III) quantitatively was selected for further experiments. The elution flow rate was not optimised because this was performed by using the same channel as the retention process (switching SV1 and SV2 to its other position with the aim of select ultrapure water channels as carrier stream). This gives rise to a total flow rate for the elution channel of  $4 \text{ mL min}^{-1}$ , which quantitative recoveries were achieved. The study of the eluent volume is important for the analytical performance of a preconcentration system because on it depends the preconcentration factor achieved. In this work, eluent volumes between 90 and  $190 \mu\text{L}$  were tested to obtain a quantitative chromium recovery. It was found that a volume of  $110 \mu\text{L}$  was enough for quantitative elution of the retained chromium.

Other flow parameter involving chromium determination such as the mixing coil length to homogenize the sample and the buffer channels was also optimised. Thus, it was verified that a length of 100 cm allows a total homogenisation of both channels.

#### *Optimisation of the on-line digestion procedure step*

The variables optimised in this step were the sonication time (stopped-flow time), digestion temperature

and nitric acid concentration for the acid sample medium. These variables were optimised by the experimental design methodology. Thus, a full two-level factorial design involving  $2^3$  experiments plus three centerpoints was built for a screening study (Statgraphics Plus statistical package V.5.1, Manugistic Inc., Rockville, U.S.A.). This optimisation was developed by using an urine sample spiked with  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  of Cr(III). The response (% recovery) was calculated against a classical off-line procedure involving urine sample digestion with nitric acid [14]. The upper and lower values examined for each factor (sonication time: 1–3 min, digestion temperature:  $20\text{--}70^\circ\text{C}$  and nitric acid concentration for the acid sample medium:  $1\text{--}4 \text{ mol L}^{-1}$ ) were selected from the available data and the experience gathered in preliminary experiments. The conclusions of this study were that sonication time and nitric acid concentration were statistically influential factors. Therefore, higher values for these variables should be tested; however if the upper value for these variables is chosen we obtained a quantitative recovery (better than 95%). The digestion temperature was not an influential factor in the range under study. As this variable presents a very small estimated effect, room temperature was selected as optimum for subsequent experiments.

#### *Analytical figures of merit*

Under the best conditions for the on-line methodology analytical characteristics were established. The equation of the calibration curve was:  $A = 2.3 \times 10^{-3} C + 5 \times 10^{-5}$ , where C is the concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and A is absorbance with a regression coefficient of 0.999. The calibration curve was linear up to a  $117.4 \mu\text{g L}^{-1}$  concentration. The detection limit based on the amount necessary to yield a net signal equal to three times the standard deviation of the blank was  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ . The precision, expressed as the relative standard deviation ( $n = 11$ ) was 1.4% at a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  level. Because certified reference materials for urine were not available for us, the accuracy of the method was examined by recovery studies. Recovery of  $10\text{--}25 \mu\text{g L}^{-1}$  spiked chromium in urine was in the range 96–101%. The sampling frequency for the complete procedure was 9 samples per hour and the preconcentration factor was 42.6 (as calculated by the ratio of the slopes of the calibration curves obtained with and without preconcentration using FAAS). A comparison of the slopes of the calibration graph and the standard

**Table 1.** Determination of chromium in urine samples

Urine sample source	Cr concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) Mean $\pm$ SD ( $n = 3$ )
Welder	$14.2 \pm 0.2$
Welder	$25.0 \pm 0.2$
Welder	$44.4 \pm 0.7$
Welder	$12.1 \pm 0.2$
Electrician	$7.1 \pm 0.2$
Mechanical	$5.1 \pm 0.2$
Control 1	$1.8 \pm 0.2$
Control 2	nd
Control 3	$2.7 \pm 0.2$
Control 4	$3.8 \pm 0.2$
Control 5	nd

SD Standard deviation; nd not detected.

addition graph using a *t*-test (95% confidence level) was made and no difference was observed, which indicated that there is not a matrix effect and demonstrates the adequacy of the proposed procedure for the FI determination of chromium in urine samples.

#### Analysis of the samples

The procedure developed in this work was applied to the determination of total chromium in real urine samples. The concentrations of chromium found in urine samples are shown in Table 1. As can be seen in Table 1, the levels of urinary chromium are significantly higher in occupationally exposed workers compared with controls (unexposed persons), and both result groups show concordance with the concentration range reported in the literature for chromium concentration found in urine samples ( $0.04\text{--}50.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) [15, 16]. Furthermore, the chromium levels found in this study (except for the chromium concentration value of  $44.4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) are within the guidance value from the biological exposure index (BEI) ( $25 \mu\text{g L}^{-1}$ ) produced by the American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) [17]. No more information about the subjects is available to provide a complete study for a biological monitoring based on analysis of chromium in urine samples to determine occupational exposure to chromium. However, the results are very helpful to demonstrate the applicability of the method.

#### Conclusions

We have extended the use of ultrasound sample pretreatment accomplishing an on-line procedure for urine sample digestion based on this energy to accel-

erate the digestion of a liquid sample. This methodology combines through a flow injection manifold sample digestion, preconcentration and chromium determination by FAAS, which is available in most laboratories. Therefore, in contrast to other FI-FAAS methodologies proposed to the date for chromium determination, this procedure involves for first time an on-line full sample preparation method for a complex liquid sample as urine, which is of particular interest to obtain several advantages such as avoiding the exposition of samples to the environment and the introduction of the sample matrix to the FAAS nebuliser, decreasing of analysis time (increasing sampling frequency), minimizing reagents and sample consumption and reduction of sample manipulation.

Furthermore, the detection limit achieved ( $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) improves the older results obtained for this analytical parameter when chromium is determined in urine samples by FAAS [6]. The determination of ultra low levels of Cr are achievable if the technique used is electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) or inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS).

#### References

- De Flora S, Badolati G S, Serra D, Picciotto A, Magnolia M R, Savarino V (1987) Circadian reduction of chromium in the gastric environment. *Mutat Res* 192: 169
- Franchini I, Mutti A (1988) Selected toxicological aspects of chromium(VI) compounds. *Sci Total Environ* 71: 379
- Sjogren B, Hedstroem L, Ulfvarson U (1983) Urine chromium as an estimator of air exposure to stainless steel welding fumes. *Int Arch Occup Environ Health* 51: 347
- Afridi H I, Kazi T G, Jamali M K, Kazi G H, Arain M B, Jalbani N, Shar G Q, Sarfaraz R A (2006) Evaluation of toxic metals in biological samples (scalp hair, blood and urine) of steel mill workers by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Toxicol Ind Health* 22: 381
- Hong C J, Lin S R (1996) Determination of urinary zinc, chromium, and copper in steel production workers. *Biol Trace Elem Res* 55: 307
- Paleologos E K, Stalikas C D, Karayannis M I (2001) An optimized single-reagent method for the speciation of chromium by flame atomic absorption spectrometry based on surfactant micelle-mediated methodology. *Analyst* 126: 389
- Narin I, Soylak M (2003) Enrichment and determinations of nickel(II), cadmium(II), copper(II), cobalt(II) and lead(II) ions in natural waters, table salts, tea and urine samples as pyrolydine dithiocarbamate chelates by membrane filtration-flame atomic absorption spectrometry combination. *Anal Chim Acta* 493: 205
- Munoz R A A, Felix F S, Augelli M A, Pavesi T, Angnes L (2006) Fast ultrasound-assisted treatment of urine samples for chronopotentiometric stripping determination of mercury at gold film electrodes. *Anal Chim Acta* 571: 93

9. Moreno-Cid A, Yebra M C (2002) Flow injection determination of copper in mussels by flame atomic absorption spectrometry after on-line continuous ultrasound-assisted extraction. *Spectrochim Acta* 57B: 967
10. Sule P A, Ingle J D (1996) Determination of the speciation of chromium with an automated two-column ion-exchange system. *Anal Chim Acta* 326: 85
11. Soylak M (2004) Solid phase extraction of Cu(II), Pb(II), Fe(III), Co(II), and Cr(III) on Chelex-100 column prior to their flame atomic absorption spectrometric determinations. *Anal Lett* 37: 1203
12. Hashemi P, Boroumand J, Fat'hi M R (2004) A dual column system using agarose-based adsorbents for preconcentration and speciation of chromium in water. *Talanta* 64: 578
13. Aydemir T, Gucer S (1996) Determination of nickel in urine by flame atomic absorption spectrometry after activated carbon enrichment. *Anal Lett* 29: 351
14. Maciel C J C, Miranda G M, Palma de Oliveira D, De Siqueira M E P B, Silveira J N, Leite E M A, Borba Da Silva J B (2003) Determination of cadmium in human urine by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta* 491: 231
15. Caroli S, Alimonti A, Coni E, Petrucci F, Senofonte O, Violante N (1994) The assessment of reference values for elements in human biological tissues and fluids: a systematic review. *Crit Rev Anal Chem* 24: 363
16. Edme J L, Shirali P, Mereau M, Sobaszek A, Boulenguez C, Diebold F, Haguenoer J M (1997) Assessment of biological chromium among stainless steel and mild steel welders in relation to welding processes. *Int Arch Occup Environ Health* 70: 237
17. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) (2004) Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati, OH, USA



Artículo IX

**ULTRASOUND-ASSISTED DIGESTION USING A FLOW-  
INJECTION/STOPPED-FLOW MANIFOLD FOR URINARY  
NICKEL DETERMINATION BY FLAME ATOMIC ABSORPTION  
SPECTROMETRY**

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

*Talanta* (enviado)





# Ultrasound-assisted digestion using a flow-injection/stopped-flow manifold for urinary nickel determination by flame atomic absorption spectrometry

R.M. Cespón-Romero, M.C. Yebra-Biurrun

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, Spain

**Abstract:** A fast and simple method based on an on-line ultrasound-assisted sample digestion procedure exploiting the stopped-flow mode, followed by flow injection nickel preconcentration using a minicolumn filled with a chelating resin (Chelite P) was developed with the aim to simplify the traditional off-line methodologies applied up to date to determine metals in urine by flame atomic absorption spectrometry. Efficiency of the on-line total digestion-preconcentration process was studied in the  $\mu\text{g L}^{-1}$  range, obtaining quantitative recoveries with good precision ( $< 5\%$ ). Finally, the proposed method was applied for determination of nickel in urine samples.

**Keywords:** Nickel, urine, flow injection, flame atomic absorption spectrometry

## 1. INTRODUCTION

The determination of a toxic metal as nickel in urine is an important clinical screening procedure. Urine is easily sampled and its determination is a suitable test for workers exposed to Ni compounds (Afridi et al 2006). Flame atomic absorption spectrometry (FAAS) still continues to be one of the most attractive

approaches for trace metals analysis in most laboratories due to its relatively low operational costs, easy operation, and high sample throughput. However, direct FAAS determination of trace amounts of nickel in urine samples is usually difficult owing to its insufficient detection power. Thus, continuous preconcentration procedures involving a flow injection (FI) manifold with a minicolumn containing a chelating resin have been shown to be efficient and effective in enhancing the sensitivity of FAAS (Yaman and Ince 2006; Lemos et al. 2006; Suvardhan et al. 2007). In these procedures, an urine pre-treatment is mandatory previous nickel preconcentration to destroy the organic matter and decompose organic nickel compounds (Aydemir and Güçer 1996). In this sense, microwave digestion is particularly suited for preparation of urine samples (Dressler et al. 2001). Although, recently, a new, safe and fast sample pre-treatment was proposed involving ultrasound-assisted oxidation (Muñoz et al. 2006). However, this sample pretreatment is performed in an off-line mode.

In this work, we explore the benefits of ultrasounds for urine sample preparation by using an on-line system exploiting the stopped-

flow mode. This novel system comprises a digestion unit connected to a FI preconcentration manifold, which is based on a minicolumn filled with a chelating resin (Chelite P, with aminomethylphosphoric acid groups). Thus, nickel is on-line eluted and determined by FAAS. The present procedure proved to be precise, accurate and sufficiently robust for routine laboratory practice, and has been applied to real urine samples for the determination of Ni.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Instrumentation

For flame atomic absorption determination of nickel, a Perkin Elmer Model 5000 air-acetylene flame atomic absorption spectrometer (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA), attached to a Perkin Elmer Model 50 Servograph Recorder with a range of 5 mV was used. The flow injection (FI) system (Figure 1) used for the on-line urine sample pre-treatment and nickel preconcentration was based on two Gilson Minipuls-3 peristaltic pumps (Gilson, France) fitted with Viton tubes, one injection valve and four switching valves (Rheodyne, USA), an ultrasonic bath (Selecta, Spain), a glass minicolumn (100 mm x 15 mm i.d., bed volume 12 mL, Omnifit, UK) used as digestion unit, and Omnifit PTFE tubes (0.8 mm i.d.) and fitting and connectors. The laboratory-made minicolumn for the on-line preconcentration step was prepared filling Viton tubes (100 x 1 mm i.d.) with 50 mg of chelating resin. All glassware and plasticware were decontaminated with 10% (V/V) nitric acid for at

least 48 h and washed three with Milli-Q water before use.

### 2.2. Reagents

All reagents were of at least analytical grade. A nickel stock standard solution of  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Merck, Germany) was used. Working standards solutions were prepared just before use by appropriate dilution of the stock standard solution. The nitric acid used to digest the urine sample and the hydrochloric acid used to elute nickel from the chelating resin were from Merck. The chelating resin for nickel preconcentration was Chelite P (Serva Electrophoresis, Germany; 20 mesh) with aminomethylphosphoric acid groups. The ammonium acetate (Merck) buffer solution ( $12 \text{ mol L}^{-1}$ ) was purified by passing it through a Chelite P minicolumn. Ultrapure water of  $18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}$  resistivity, obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA USA) was used for the preparation of the reagents and standards.

### 2.3. Samples and Sample Treatment

The urine of from 7 workers exposed to welding fumes and from 7 healthy unexposed volunteers was collected in polyethylene vessels. The urine specimens were filtered through a  $0.45 \mu\text{m}$  Millipore membrane filter. Concentrated nitric acid was added to the samples (2.7 mL for each 7 mL of sample), so that the samples are in a  $4 \text{ mol L}^{-1}$  nitric acid medium. The samples were stored in a refrigerator ( $\sim 4^\circ\text{C}$ ) for no longer than 2 weeks.

### 2.4. Analytical Procedure

The FI system used for nickel determination in urine samples is shown in Figure 1. In a first step is carried out the urine sample digestion. Thus, the urine sample (7 mL) in  $4 \text{ mol L}^{-1}$  nitric acid



medium is inserted into the flow system at  $7 \text{ mL min}^{-1}$  by means of a peristaltic pump (P2). Once all the sample volume is located in the digestion unit (DU), which is immersed in a ultrasonic bath at room temperature, the pump controlling the sample stream (B2) was stopped for a period of 3 min. After, the selecting valve (SV2) was switched to its other position, and pump B2 was again activated. In this way, the digested sample arrives at the part of the FI system where the preconcentration step takes place. For this, the digested sample stream converged with the buffer stream ( $12 \text{ mol L}^{-1}$  ammonium acetate) in order to obtain the optimum pH value for nickel retention in the chelating resin. Both channels are homogenised in the mixing coil and then, the resulting stream passed through the minicolumn containing the chelating resin (Chelite P). The sample matrix is sent to waste, while ultrapure water flowing through the detector. Finally, nickel is eluted by injection of a volume of  $110 \text{ }\mu\text{L}$  of  $3 \text{ mol L}^{-1}$  hydrochloric acid into a water carried stream, which swept it to the FAAS detector where is continuously monitored.

In order to avoid carry-over, a washing step was including in the analysis cycle. Thus, the digestion unit was washed with ultrapure water during 30 s after each sample measurement.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Optimisation of the Preconcentration Step

In order to improve the sensitivity of the method, the FI manifold includes a preconcentration minicolumn filled with a chelating resin. Chelite P and  $3 \text{ mol L}^{-1}$  hydrochloric acid were selected

as chelating resin and eluent, respectively, based on the good results reported in the literature for the nickel preconcentration by using aminomethylphosphoric acid as chelating group (Maeda and Egawa 1987; Yebra-Biurrun et al. 1995). To determine the optimum values of the variables involving the preconcentration step, a study of these variables was performed for a synthetic urine matrix prepared according to Aydemir and Güçer 1996 (dissolving 17 g NaCl, 2.6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 3.8 g KCl, 2.38 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.72 g  $\text{CaCl}_2$  and 1.16 g  $\text{MgCl}_2$  in 2.7 L of ultrapure water). This synthetic urine was spiked with nickel (resulting concentration  $20 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  Ni). In order to achieve the optimum pH conditions for Ni retention on the chelating resin, the recovery of nickel was examined by using different concentrations for the ammonium acetate buffer channel (between  $0\text{--}12 \text{ mol L}^{-1}$ ) and different values for its flow rate (between  $0.5\text{--}2 \text{ mL min}^{-1}$ ). Thus, it had proved that optimum pH for Ni recoveries up to 95% were found if the concentration of ammonium acetate buffer channel is  $12 \text{ mol L}^{-1}$  and its flow rate  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . The retention flow rate was optimised in the range  $0.5\text{--}4 \text{ mL min}^{-1}$  (taking into account that the flow rate of the buffer channel is  $2 \text{ mL min}^{-1}$ ) and the results were that the recovery increased when the flow rate decreased up to  $2 \text{ mL min}^{-1}$ , so a sample flow rate of  $2 \text{ mL min}^{-1}$  to retain nickel quantitatively was selected for further experiments. The elution flow rate was not optimised because this was performed by using the same channel as the retention process, although switching SV1 and SV2 to its other position with the aim of select ultrapure water channels as carrier stream. This gives rise to a

total flow rate for the elution channel of 4 mL min<sup>-1</sup>, which quantitative recoveries were achieved. The study of the eluent volume is important for the analytical performance of a preconcentration system because on it depends the preconcentration factor achieved. In this work, eluent volumes between 90-190 µL were tested to obtain a quantitative nickel recovery. It was found that a volume of 110 µL was enough for quantitative elution of the retained nickel.

Other flow parameter involving nickel determination such as the mixing coil length to homogenize the sample and the buffer channels was also optimised. Thus, it was verified that a length of 100 cm allows a total homogenisation of both channels.

### **3.2. Optimisation of the On-line Digestion Procedure**

The variables optimised in this step were the sonication time (stopped-flow time), digestion temperature and nitric acid concentration for the acid sample medium. These variables were optimised by the experimental design methodology, as they were presumably interrelated. A full two-level factorial design involving 2<sup>3</sup> experiments plus three center points was built for a screening study (Statgraphics Plus statistical package V.5.1, Manugistic, Inc. Rockville, USA). This optimisation was developed by using an urine sample spiked with 15 µg L<sup>-1</sup> of Ni. The response (recovery) was calculated against a classical off-line procedure involving urine sample digestion with nitric acid (Maciel et al. 2003). The upper and lower values examined for each factor were sonication time: 1-3 min, digestion temperature: 20-70 °C and nitric acid concentration for the

acid sample medium: 1-4 mol L<sup>-1</sup>). The conclusions of this study were that sonication time and nitric acid concentration were influential factors. Higher values for these variables should be tested; however if the upper value for these variables is chosen we obtained a quantitative recovery (better than 95%). The digestion temperature was not an influential factor in the range under study. As this variable present a very small estimated effect, room temperature was selected as optimum for subsequent experiments.

### **3.3. Analytical Figures of Merit**

The characteristic performance data for the proposed method under the optimum conditions are presented in Table 1. The preconcentration factor was calculated by the ratio of the slopes of the calibration curves obtained with and without preconcentration using FAAS, and the detection limit was calculated by the 3s criterion.

For method validation the recovery of the nickel spiked into urine samples was studied. For this, increasing amounts of Ni were added to five urine samples randomly chosen, in such a way that the total Ni concentration remained within the linear range of the calibration curve. The average recovery was of 99.1±1.6 (range 97.5–100.7%), indicating the adequacy of the procedure for the determination of Ni in urine samples.

### **3.4. Analysis of Samples**

The procedure developed in this work was applied to the determination of Ni in real urine samples. The nickel concentrations found in the urine samples of the non-exposed persons (urine control) were in the range not detected-5.6 µg L<sup>-1</sup>, showing concordance with the

concentration range reported in the literature ( $0.06\text{--}8.0\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Caroli et al. 1994). The nickel concentrations found in the urine of workers exposed to welding fumes were in the range  $10.5\text{--}20.2\ \mu\text{g L}^{-1}$ . These results are in agreement with those reported by Horng et al. 2002, and according to these authors as in the analysed samples all nickel concentrations are less than  $25\ \mu\text{g L}^{-1}$ , the nickel values obtained for urine samples analysed are considered normal.

#### 4. CONCLUSIONS

An on-line procedure for determination of urinary nickel is described, which combines sample digestion, preconcentration and nickel determination by FAAS, which is available in most laboratories. The results obtained show that traces of nickel can be accurately determined in a complex matrix sample like urine by a simple and inexpensive FI analytical methodology. The sampling frequency was of at least 6 samples per hour with minimum of sample preparation.

The results of sample analysis show that the urine from workers exposed to welding fumes has nickel concentrations significantly elevated when are compared with the urine control. However, any sample presents a nickel concentration higher than  $25\ \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### REFERENCES

- Afridi, H.I., Kazi, T.G., Jamali, M.K., Kazi, G.H., Arain, M.B., Jalbani, N., Shar, G.Q., and Sarfaraz, R. A. 2006. Evaluation of toxic metals in biological samples (scalp hair, blood and urine) of steel mill workers by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Toxicol. Ind. Health*, 22: 381.
- Aydemir, T., and Gucer, S. 1996. Determination of nickel in urine by flame atomic absorption spectrometry after activated carbon enrichment. *Anal. Lett.*, 29: 351.
- Caroli, S., Alimonti, A., Coni, E., Petrucci, F., Senofonte, O., and Violante, N. 1994. The assessment of reference values for elements in human biological tissues and fluids: A systematic review. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 24: 363.
- Dressler, V. L., Pozebon, D., and Curtius, A. J. 2001. Determination of Ag, Te, U and Au in waters and in biological samples by FI-ICP-MS following on-line preconcentration. *Anal. Chim. Acta*, 438: 235.
- Horng, C.J., Tsai, J.L., Horng, P.H., Lin, S.C., Lin, S.R., and Tzeng, C.C. 2002. Determination of urinary lead, cadmium and nickel in steel production workers. *Talanta*, 56: 1109.
- Lemos, V.A., Gama, E.M., and Lima, A.S. 2006. On-line preconcentration and determination of cadmium, cobalt and nickel in food samples by flame atomic absorption spectrometry using a new functionalized resin. *Microchim. Acta*, 153 :179.
- Maciel, C.J.C., Miranda, G.M., Palma de Oliveira, D., De Siquiera, M.E.P.B., Silveira, J.N., Leite, E.M.A., and Borba Da Silva, J.B. 2003. Determination of cadmium in human urine by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 491: 231.
- Maeda, H., and Egawa, H. 1987. Studies of selective adsorption resins. XXV. Preparation of macroreticular chelating

resins containing aminomethylphosphonic acid groups from methyl methacrylate/divinylbenzene copolymer beads and their adsorption capacity. *J. Appl. Polym. Sci.*, 33: 1275.

Muñoz, R.A.A., Felix, F.S., Augelli, MA., Pavesi, T., and Angnes, L. 2006. Fast ultrasound-assisted treatment of urine samples for chronopotentiometric stripping determination of mercury at gold film electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 571: 93.

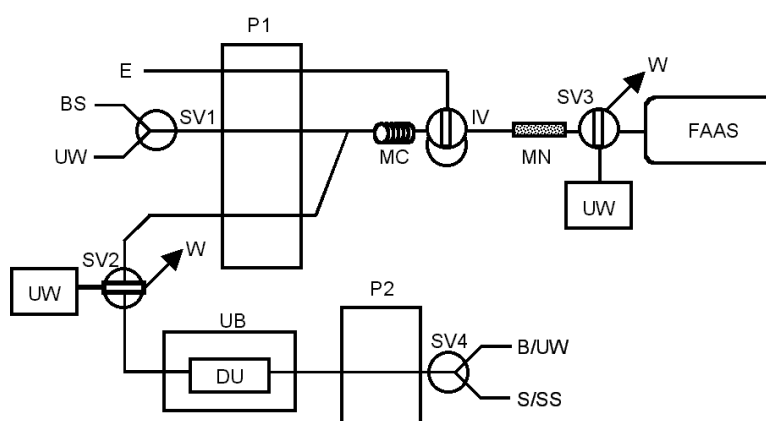
Suvardhan, K., Rekha, D., Kumar, K.S., Prasad, P.R., Kumar, J.D., Jayaraj, B., and Chiranjeevi, P. 2007. Novel analytical reagent for the application of cloud-point preconcentration and flame atomic absorption spectrometric determination of nickel in natural water samples. *J. Hazard. Mater.*, 144: 126.

Yaman, M., and Ince, M. 2006. Solid phase extraction and preconcentration of nickel in mineral waters with PAR-loaded Amberlite XAD-7 and determination by flame atomic absorption spectrometry. *Atom. Spectrosc.*, 27: 186.

Yebra-Biurrun, M.C., Bermejo-Barrera, A., Bermejo-Barrera, M.P., and Barciela-Alonso, M.C. 1995. Determination of trace metals in natural waters by flame atomic absorption spectrometry following online ion-exchange preconcentration. *Anal Chim Acta*, 303: 341.

**Table 1.** Analytical performance data of the on-line digestion/preconcentration method for nickel determination in urine samples by FAAS

Preconcentration factor	61.9
Sample volume (mL)	7
Linear range ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	2.1-32.4
Regression equation (n=7); [Ni] in $\mu\text{g L}^{-1}$	$A = 1.92 \times 10^{-3} [\text{Ni}] + 5,0 \times 10^{-4}$
Correlation coefficient	$r = 0.9993$
Detection limit (3s) ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.6
Precision (RSD, n=11) (%)	1.7-4.4
Sampling frequency (samples $\text{h}^{-1}$ )	6



**Figure 1.** Continuous manifold for Ni determination in urine samples. BS:  $12 \text{ mol L}^{-1}$  ammonium acetate (buffer solution); B: blank; DU: digestion unit; E: eluent ( $3 \text{ mol L}^{-1}$  HCl); FAAS: flame atomic absorption spectrometer; IV: injection valve; MC: mixing coil; MN: minicolumn containing the chelating resin (Chelite P); P1 and P2: peristaltic pumps; S/SS: sample or standard solution ( $4 \text{ mol L}^{-1}$  nitric acid medium); SV1, SV2, SV3 and SV4: switching valves; UB: ultrasonic bath; UW: ultrapure water; W: waste.



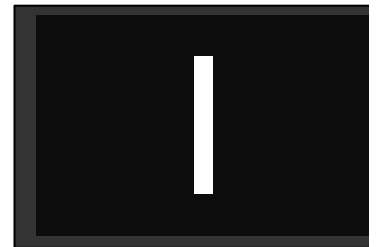
Comunicación I

**AUTOMATIC DETERMINATION OF NICKEL IN WORKPLACE  
AIR BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY**

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

***3rd International Conference on Occupational Risk Prevention***

Santiago de Compostela, 2-4/6/2004









Filling the gap between  
practitioners' and scientists'  
point of views about  
occupational risk prevention



# 3<sup>rd</sup> International Conference on Occupational Risk Prevention

## Proceedings

Edited by  
Pedro R. Mondelo  
Markku Mattila  
Waldemar Karwowski  
Andrew Hale

ISBN: 84-933328-2-8

Santiago de Compostela, Galicia, Spain  
June 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> & 4<sup>th</sup>, 2004



# Automatic Determination of Nickel in Workplace Air by Atomic Absorption Spectrometry

**Cespón Romero, Rosa M<sup>a</sup>**

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology / Faculty of Chemistry / University of Santiago de Compostela / Av. de las Ciencias, s/n/15782 Santiago de Compostela, Spain

+34 981563100/ qncayebi@usc.es

**Yebra Biurrun, M<sup>a</sup> del Carmen**

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology / Faculty of Chemistry / University of Santiago de Compostela / Av. de las Ciencias, s/n/15782 Santiago de Compostela, Spain

+34 981563100/ qncayebi@usc.es

## ABSTRACT

The determination of nickel in workplace air involves a digestion procedure for the cellulose-ester membrane filter with concentrated acids. This is a time-consuming procedure, which also is prone to contamination or analyte loss. Besides, it has special precautions to be performed because the special care for acids handling and the health risk to the analyst caused by the vapors produced during the acid digestion. In this work a simple and rapid automatic ultrasound-assisted extraction system coupled to a flow injection manifold is presented. The method is employed for the determination of nickel in real metal fume samples from welding operations.

## Key words

Nickel, workplace air, atomic absorption spectrometry

## INTRODUCTION

The welding exposure is unique, there is no material from any other source directly comparable to the composition and structure of welding fumes. It was considered that welding is one of the most hazardous occupations. There are several reasons why welding is a dangerous occupation: (a) there are a multiplicity of factors that can endanger the health of a welder, such as heat, burns, radiation, noise, fumes, gases, electrocution, and even the uncomfortable postures involved in the work; (b) the high variability in chemical composition of welding fumes which differs according to the workpiece, method employed, and surrounding environment; and (c) the routes of entry through which these harmful agents access the body. Common chemical hazards include metal particulates and noxious gases [1].

The particulates and gases generated during welding are considered to be the most harmful exposure in comparison with the other byproducts of welding. The fume refers to the solid metal suspended in air, which forms when vaporized metal condenses into very small particulates. The vaporized metal becomes oxidized when it comes in contact with oxygen in air, so that the major components of the fume are oxides of metals used in the manufacture of the consumable electrode wire fed into the weld. Some metal constituents of the fumes may pose more potential hazards than others, depending on their inherent toxicity [2].



Nickel is one of the most common welding fume components because it is a component of many alloys and it is present in stainless steel. Inhaled nickel tends to accumulate in the nasal mucosa and lungs. Furthermore, this is a potentially carcinogenic metal found in fumes from the welding of nickel-plated mild steel, and stainless steel and high-strength low-alloy steel electrodes. Nickel oxide has been found to be carcinogenic in laboratory animals. Irritation of the respiratory tract has occurred in stainless steel welders. Other studies have indicated that stainless steel welding fumes containing nickel are potentially mutagenic. Epidemiological studies suggest that stainless steel welders have an increased risk for developing lung cancer due to elevations in nickel. However, this elevated risk has not been definitively shown to be associated with exposure to specific fume components and processes of welding [3-4]. Therefore, the health hazards of nickel require protection of the workers and have an appropriate analytical methodology for regular nickel monitoring in the workplace. The occupational exposure limits (VLA) for metallic nickel, for soluble nickel compounds and for insoluble nickel compounds are 1, 0.1 and 0.2 mg/m<sup>3</sup>, respectively [5].

Nickel proceeding from welding fumes has been determined by radiochemical [6] and x-ray fluorescence [7], but atomic absorption spectrometry (AAS) and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) are the major routine analytical techniques owing to the combination of many advantages, such as high sensitivity and selectivity, good accuracy, adequate precision, etc. [8-10]. Therefore, these techniques are chosen by the Norma UNE 81-587-94 [11], by the accepted method of the Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) [12], by the Manual of Sampling and Analytical Methods (Occupational Safety & Health Administration, OSHA) [13], and by the Manual of Analytical Methods (Occupational Safety & Health Administration, NIOSH) [14].

Industrial hygienic studies typically require the collection and analysis of a large number of samples. According to the official manuals of analytical methods, the determination of nickel in workplace air involves a digestion procedure for the cellulose ester membrane filter with nitric acid, or acid mixtures. This is a time-consuming procedure, which also is prone to contamination or analyte loss. Besides, it has special precautions to be performed because the special care for acids handling and the health risk to the analyst caused by the vapors produced during the sample acid digestion.

In this work a simple and rapid automatic ultrasound-assisted extraction system (CUES) coupled to a flow injection manifold is presented. Nickel is continuously extracted with this device from the cellulose ester membrane filter with diluted nitric acid and determined on-line by flame atomic absorption spectrometry. The results obtained demonstrated that this method is simple, inexpensive, fast, quantitative, and sufficiently sensitive for the nickel determination in metal fumes. The method is successfully employed for the determination of nickel in welding fumes.

## **EXPERIMENTAL**

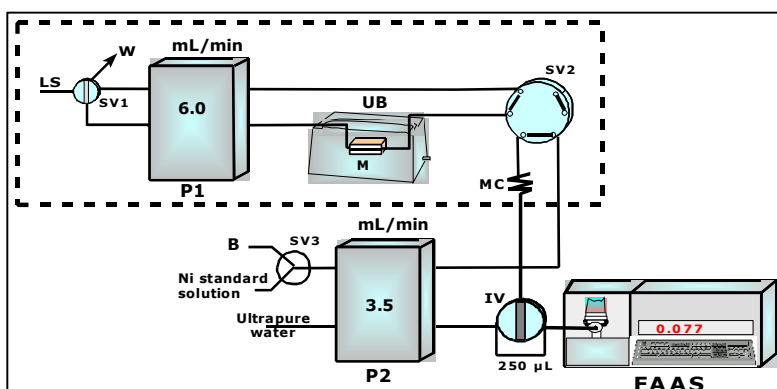
### **Reagents**

Ultrapure water of 18.2 M $\Omega$ cm resistivity, obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA USA) was used for the preparation of the reagents and standards. Hydrochloric acid, nitric acid (Merck, Germany) and 1000  $\mu$ g/ml nickel standard (Merck, Germany) were analytical reagent grade.

### **Apparatus**

A Perkin Elmer Model 5000 atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer,

Shelton, CT-USA) fitted with a nickel hollow cathode lamp was used. The instrument was set at 232.0 nm. The spectrometer output was connected to a Perkin Elmer Model 50 Servograph Recorder with a range of 5 mV. The flow injection system (Figure 1) comprises two Gilson Minipuls-3 peristaltic pumps (Gilson, France) fitted with PVC tubes, an ultrasonic bath (Selecta, Barcelona, Spain), four Rheodyne injection or switching valves (USA), Models 5041 and 5301 and a glass minicolumn (100 mm x 3 mm i.d., bed volume 700 mL) (Omnifit, UK). The ends of minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541). Workplace air samples were pumped with a Gilian HFS-513 air sampling pump with constant high flow of 750 to 5000 mL/min (Sensidyne, USA). Welding fumes were collected on Millipore (Bedford, USA) mixed cellulose ester filters (0.8  $\mu$ m pore size). Each filter is in a polystyrene cassette of 37 mm diameter furnished with a cellulose support.



**Figure1.-** Schematic diagram of the CUES and optimum working conditions for the on-line Ni determination. P1 and P2: peristaltic pumps; UB: ultrasonic bath; M: minicolumn; IV: injection valve; SV: switching valves; MC: mixing coil; W: waste; B: blank and FAAS: flame atomic absorption spectrometer.

### Sampling of welding fumes

Experiments were performed during regular welding in a welding shop. Welding fumes were collected during the welding of stainless steel (18% Ni) with gas metal arc welding (GMAW) including an electrode containing a 10% of Ni. In order to estimate the exposure of welders at the workplace, were investigated three stationary sampling sites in the workplace environment, 2, 1 and 0.5 m away from the breathing zone (sampling sites I, II and III, respectively) and by attaching the sampler to the worker's belt and placing the filter holder near his respiratory tract (sampling site IV). As soon as the worker began welding, pumps were started and evolved fumes were collected for 15-60 min at a sampling flow rate of 1.5 L/min. Collection of welding fumes took place only during the welding process.

### Procedure for nickel determination

The continuous nickel determination system is shown in Fig. 1. Each filter is introduced into a glass minicolumn, and in order to avoid sample losses over the CUES circuit, its ends are plugged with filter paper (Whatman 541). Then, the minicolumn is connected to the CUES. First, the CUES circuit (2 mL) is on-line loaded with the acid leaching solution (3 M nitric acid). Then, the SV1 is switched to its other position being in this way the CUES circuit closed. The leaching solution is circulated at 6.0 mL/min through the minicolumn during 8 min under ultrasonic treatment and at a temperature of about 80 °C. Elapsed this time, the SV2 is switched to its other position and the acid extract circulates towards the mixing coil in order to be homogenized. A volume of 250  $\mu$ L of this acid extract is injected by means of a IV into an ultrapure water carrier

stream that transport it to the detector. While sample measurement is accomplished the CUES circuit is washed with ultrapure water in order to avoid carry-over. Standard solutions containing between 0 and 2 µg/mL of nickel, in the same acid medium as the leaching solution, are injected into an ultrapure water carrier stream by mean of IV.

## RESULTS AND DISCUSSION

The optimization of the whole proposed procedure was focused to the continuous ultrasound extraction step. The determination step was optimized taken into account the optimum values founded for the CUES. Therefore, the variables studied in principle are those involving the CUES (nitric acid concentration, hydrochloric acid concentration, sonication time, leaching temperature, flow rate of the CUES and leaching volume). In order to study the behavior of these variables, a factorial Plackett-Burman  $2^{6*3/16}$  type III resolution design allowing 6 degrees of freedom plus one center point was built, which involved 13 non-randomized runs, in order to test statistical significance of the effects, an ANOVA are employed by Statgraphic V. 4.0. This factorial design has been applied on samples taken at the sampling site III. The nickel concentration in the sampling site II ( $20.1 \pm 1.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ,  $n=9$ ) was obtained accomplishing the INSHT method [12]. The variable response (% extraction efficiency) was calculated according to the following equation:

$$\% \text{Extraction efficiency} = \frac{[\text{Ni}] \text{ continuous acid leaching}}{[\text{Ni}] \text{ official method}} \times 100$$

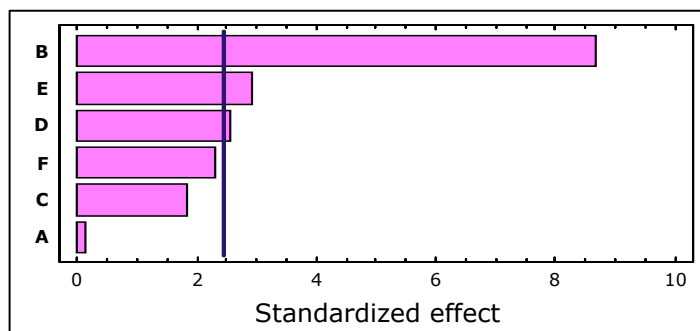
Ni concentrations in the acid leachate were measured twice.

Table 1 shows the lower and upper levels for each studied variable. These values chosen from available data and experiences developed in previous experiments.

**Table 1.** - Factor levels in the Plackett Burman factorial design

Variable	Key	Low (-)	High (+)
Flow rate of the CUES (mL/min)	A	3	6
HNO <sub>3</sub> concentration (M)	B	0	3
HCl concentration (M)	C	0	3
Sonication time (min)	D	0.5	5
Leaching temperature (°C)	E	20	70
Leaching volume (mL)	F	2	5

The numerical analysis of the results produced the standardized main effects Pareto Chart (Fig. 2). The conclusions of this screening study are that concentration of nitric acid, the sonication time and the temperature are influential factors between the ranges studied because these factors overtake the limit of statistical significance (95%). All significative factors have a positive influence, this means that for the levels tested, an increase of these factors provides better extraction efficiency. The hydrochloric acid concentration, the flow-rate of the CUES and leaching volume are not statistically influential factors for the levels tested.



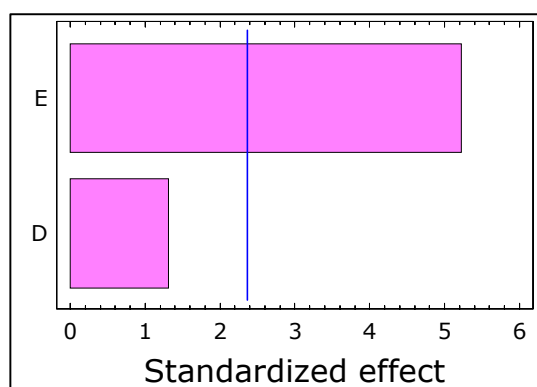
**Figure 2.-** Standardized Pareto chart for the Plackett Burman Design ( $2^6 \cdot 3/16$ ). The vertical line indicates the statistical significance ( $P=95\%$ ) bound for the effects.

Due to the Plackett-Burman design only provides the tendencies to the optimum of the variables, a new factorial design shifted in the direction of higher temperature and higher sonication time was performed in order to tune their values to obtain the maximum % extraction efficiency. The nitric acid concentration was fixed to because higher acid concentrations can produce serious damages in the spectrometer nebulizer of FAAS and with this concentration a quantitative % extraction efficiency was achieved (98.5 %). For this, we used an orthogonal central composite design,  $2^2$  + star with two center points, resulting in 10 non randomized runs with 4 error degrees of freedom. Axial distance ( $\alpha$ ) was selected having a value of 1.07809 in order to establish the orthogonality condition. These experiments were performed keeping all the other factors at optimum values (according to factorial screening design): nitric concentration 3 M, hydrochloric acid concentration 0 M, leaching volume 2 mL and flow-rate of the CUES 6.0 mL/min. The results thus obtained are shown in Table 2, together with the corresponding matrix design. A Pareto chart for this experiment (Figure 3) confirmed that only the temperature was statistically significant. Given these findings, we decide to work with the optimum operational conditions given by the central composite design: leaching temperature 79 °C and sonication time 8 min.

**Table 2.-** Design matrix and response values

Nº	D	E	% Extraction efficiency
1	7	65	94.5
2	4	50	66.2
3	10	50	71.1
4	4	80	98.5
5	10	80	96.5
6	3.8	65	76.6
7	10.2	65	96.5
8	7	49	62.7
9	7	81	100
10	7	65	96.5

points)



**Figure 3.-** Pareto chart of main effects in the central composite design ( $2^2$ + star with two center

Other flow parameters involving nickel determination were also optimized. The mixing coil length was fixed to 400 cm (equivalent to 2 mL), because a short length would not achieve the total homogenization of the extract and a longer length would increase too much the time of analysis, diminishing in this way the sampling

frequency. The carrier flow rate and the injected volume were also studied. The carrier flow rate was studied between 3-6 mL/min and the injected volume of the acid extract between 100-400  $\mu\text{L}$ . The aspiration flow-rate of the nebulizer was adjusted to be the same as the flow-rate of the carrier solution. Although the higher aspiration flow-rate provides better sensitivity, at the same time a higher dispersion takes place because the carrier flow-rate is increasing. Therefore, a carrier flow-rate of 3.5 mL/min (dispersion equal to 1.1) was chosen as a compromise to obtain the minimum dispersion in the flow system. With regard to the injected volume it was verified that, as it is logical, when the volume was increased the sensitivity was increased. Therefore, a volume of 250  $\mu\text{L}$  was chosen, which, in addition, allows making at least two injections of each acid extract verifying its homogeneity.

### Analytical figures of merit

The calibration graph of the method was run ( $n=7$ ) under the optimal chemical and flow conditions for the global process. The equation was:  $\text{absorbance} = 2.6 \times 10^{-4} + 0.031[\text{Ni}]$  ( $r=0.9999$ ;  $[\text{Ni}]=0-2 \mu\text{g/L}$ ). The limit of detection (LOD) based on three times the standard deviation ( $n=30$ ) of the blank was found to be 4.4, 2.2 and 1.1  $\mu\text{g/m}^3$  Ni, for sampling times of 15, 30 and 60 min, respectively. The relationship between the absorbance signal and the nickel concentration was found to be linear over the ranges of 14.2-177.8, 7-88.9 and 3.6-44.4  $\mu\text{g/m}^3$  for sampling times of 15, 30 and 60 min, respectively.

The precision of the continuous analytical method was checked for 9 real samples obtained at the sampling site IV (sampling time 15 min). The mean  $\pm$  standard deviation obtained was  $138.3 \pm 2.4 \mu\text{g/m}^3$  Ni, which results in a relative standard deviation of 1.7%.

The sample throughput of the nickel determination, taking into account the global process, was ca. 7 samples per hour.

To study the interferent effects of the principal components present in welding fume samples (Cr, Fe, Al, Ca, Zn, Cd, Cu, Pb, Mg, Co, Mo, Mn and Hg) on the measurement of Ni, mixtures of the different metals (1  $\mu\text{g/mL}$  of each metal) were prepared. The results indicate that the method is free from interferences, because signal variations greater than  $\pm 5\%$  were not obtained when each ion was tested individually or simultaneously.

### Determination of nickel in workplace samples

Nickel was determined in welding fume samples, which are collected as described earlier. The sampling times were the following: sampling site I, 60 min; sampling site II, 30 min; and sampling sites III and IV, 15 min. The results obtained are shown in Table 3.

**Table 3.-** Nickel determination in welding fumes

	[Ni] $\mu\text{g/m}^3$
Sampling site I	$9.7 \pm 0.5$
Sampling site II	$21.1 \pm 0.9$
Sampling site III	$84.6 \pm 2.0$
Sampling site IV	$139.1 \pm 2.1$

## CONCLUSIONS

The applied continuous procedure was found to be a reliable and sensitive technique for the determination of Ni in welding fumes. The main goals obtained with



the proposed method are reduction of sample contamination as well as analyte losses because less manipulation of the sample is required. Furthermore, reagents amounts are reduced and the sample preparation time is minimized. This procedure combines the benefits of ultrasound-assisted extraction with those obtained for the flow injection systems.

The concentrations of Ni at the workplace investigated (up to 0.14 mg/m<sup>3</sup>, corresponding to the sample site IV) were far below the occupational exposure limit value (VLA) for nickel prescribed by Spanish regulations.

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to the financial support provided by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project no. CAL01-043).

#### REFERENCES

1. Saito, H., Ojima, J., Takaya, M., Iwasaki, T., Hisanaga, N., Tanaka, S., Arito, H. (2000) Laboratory measurement of hazardous fumes and gases at a point corresponding to breathing zone of welder during a CO<sub>2</sub> arc welding. En: *Ind. Health*, 38,69-78.
2. Lee, Ch. R., Yoo, Ch.I., Lee, J.H., Kang, S.K. (2002) Nasal septum perforation of welders. En: *Ind. Health*, 40, 286-289.
3. Costa, M. (1991) Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis. En: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 31,321-337.
4. Hedenstedt, A.; Jenssen, D.; Lidesten, B.; Ramel, C.; Rannug, U.; Stern, R. M. (1977).Mutagenicity of fume particles from stainless steel welding. *Scand. J. Work Environ. Health* 3,203-211.
5. INSHT (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo), Límites de exposición profesional para agentes químicos (2004). [http://www.mtas.es/insht/information/guias/vla\\_001.htm](http://www.mtas.es/insht/information/guias/vla_001.htm).
6. Tolgyessy, J., Olah, L., Klehr, E. H. (1987) Contribution to the radioanalytical determination of heavy metals in the working environment of welders. En: *J. Radioanal. Nucl. Chem.*,114,101-104.
7. Swamy, K., Kaliaperumal, R., Swaminathan, G. S. (1994) Wavelength-dispersive x-ray fluorescence spectrometric technique for determining elements in weld fumes. En: *X-Ray Spectrom.*, 23, 71-74.
8. Paudyn, A. M., Smith, R. G. (1990) Applications of inductively coupled plasma atomic emission spectrometry in occupational health. En: *J. Anal. At.Spectrom.*, 5, 523-529.
9. Hernández López, M., Arbaizar, A. (1993) Determination of trace amounts of nickel in welding fumes by solvent extraction flame atomic absorption spectrometry. En: *At. Spectrosc.*, 14,148-151.
10. Bellido-Milla, D., Jimenez-Jimenez, A., Hernandez-Artiga, M.P., De Cisneros, J.L. Hidalgo-Hidalgo (1997) Viability of analysis of variance applied to the data obtained from the atomic absorption spectrometric determination of the metal content in welding fumes. En: *J. Anal. At.Spectrom.*, 12, 323-328.
11. Norma UNE 81-587-94. (1999) Calidad del aire. Atmósferas en el puesto de trabajo. Determinación de metales y sus compuestos iónicos en el aire. Métodos de Ensayo para Evaluar los Riesgos Producidos por Sustancias Peligrosas en el Lugar de Trabajo. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR).
12. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, MTA/MA-025/A92- Determination of metals and their ionic compounds in air - Membrane filter method / Atomic absorption spectroscopy.

### **ORP2004 - 3rd International Conference on Occupational Risk Prevention**

[http://www.mtas.es/insht/mta/MA\\_025\\_A92.htm](http://www.mtas.es/insht/mta/MA_025_A92.htm)

13. Occupational Safety & Health Administration (OSHA), Manual of Sampling and Analytical Methods, ID-121, ID-125. <http://www.osha-slc.gov/>.
14. US National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH, Manual of Analytical Methods (1994), US Government Printing Office, 4th ed.

Comunicación II

**FLOW INJECTION DETERMINATION OF HEXAVALENT  
CHROMIUM IN WORKPLACE AIR BY ATOMIC ABSORPTION  
SPECTROMETRY**

M. C. Yebra-Biurrun, R. M. Cespón-Romero

***10th International Conference on Flow Analysis***

Porto (Portugal), 3-8/9/2006








Porto

Portugal

3 to 8

September

2006



flow analysis

10<sup>th</sup> International Conference





## FLOW INJECTION DETERMINATION OF HEXAVALENT CHROMIUM IN WORKPLACE AIR BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

M. Carmen Yebra-Biurrun and Rosa M. Cespón-Romero

Department of Analytical Chemistry, Nutrition & Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain  
email: qncayebi@usc.es  
email: scijjkmn@chiangmai.ac.th

Occupational exposures to Cr(VI) compounds occur during the production of stainless steels, chromate chemicals, and chromate pigments. Cr(VI) exposures also occur during other work activities such as stainless steel welding, thermal cutting, chrome plating, painting, and coating processes. Cr(VI) compounds are considered to be potential occupational carcinogens. Other adverse health effects associated with Cr(VI) exposure include allergic contact dermatitis, occupational asthma, nasal irritation and ulceration, etc. [1]. Therefore, the development of analytical methods for the determination of Cr(VI) is a subject of significant interest in occupational and environmental health.

Analysis of Cr(VI) in industrial hygiene samples generally requires two major steps: extraction and detection. An optimal extraction procedure should completely extract Cr(VI) species without disturbing the species distribution [2]. Thus, several extraction methods have been proposed for the alkaline extraction of Cr(VI) from workplace air filters based on the use of ultrasounds as an auxiliary energy to accelerate and simplify this process [3,4]. However, these approaches are based on an off-line extraction, so fully automation of the methods developed is unable. In this work, a fully on-line procedure is proposed coupling ultrasound assisted extraction and a flame atomic absorption spectrometric detection through a flow injection interface. Extraction parameters such as sonication time, nature and concentration of the alkaline solution used as leaching solution, leaching temperature, flow-rate of the continuous manifold and leaching solution volume have been optimised using experimental designs. The developed method has been applied to the determination of Cr(VI) in welders' workplace environments.

- [1] J. N. Dennis, M.J. French, P.J. Hewitt, S.B. Mortazavi, C.A.J. Redding, *Ann. Occup. Hyg.*, 46 (2002) 43.
- [2] M.J. Marqués, A. Salvador, A.E. Morales Rubio, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 362 (1998) 239.
- [3] K. Ndungu, N. Djane, F. Malmus, L. Mathiasson, *Analyst*, 124 (1999) 1367.
- [4] J. Wang, K. Ashley, D. Marlow, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 1027.





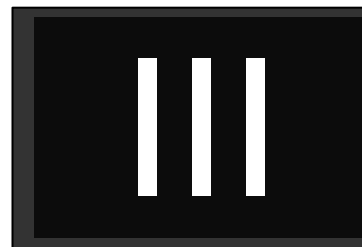
Comunicación III

**Flow injection determination of lead and cadmium in hair  
samples from workers exposed to welding fumes**

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

***10th International Conference on Flow Analysis***

Porto (Portugal), 3-8/9/2006








Porto

Portugal

3 to 8

September

2006



flow analysis

10<sup>th</sup> International Conference



## FLOW INJECTION DETERMINATION OF LEAD AND CADMIUM IN HAIR SAMPLES FROM WORKERS EXPOSED TO WELDING FUMES

Rosa M. Cespón-Romero and M. Carmen Yebra-Biurrun

Department of Analytical Chemistry, Nutrition & Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain  
email: qncayebi@usc.es

Human hair has been demonstrated to be one of the major vehicles of excretion of trace elements from the human body. Therefore, the concentration of toxic elements such as cadmium and lead in human hair is a biological index for monitoring occupational exposure. This biological material is an interesting matrix because concentrations in hair are up to ten-fold higher than the levels found in blood or urine samples. Other advantages are the simplicity of sampling, storing and transport [1].

As human hair is a solid sample, its dissolution is necessary in order to determine trace metals. Thus, different sample pre-treatments for trace elements determination have been proposed, mainly involving acid digestion. Nevertheless, these procedures are time consuming, prone to analyte losses and require large volumes of mineral acids. In addition, nitrous fumes, highly carcinogenic, are commonly formed during these procedures. In contraposition, it has been proven that ultrasonic assisted extraction with diluted acids is an excellent and effective way of extracting a number of analytes from different types of samples, above all, performed in the continuous mode with a flow injection system [2].

In this work is presented an on-line procedure for the continuous ultrasound-assisted extraction of cadmium and lead from hair samples and their determination by flame atomic absorption spectrometry using a flow injection manifold. First, a Plackett-Burman design was used to establish the significant variables affecting the continuous ultrasound-assisted extraction. Then, a central composite design was performed to obtain the optimum conditions. The variables under study were: sonication time, nature and concentration of the acid solution used as leaching solution, leaching temperature, flow-rate of the continuous manifold and leaching solution volume. The significant variables ( $P=95\%$ ) were nitric acid concentration, sonication time and leaching temperature. The proposed method was applied with satisfactory results to the determination of Cd and Pb in human hair samples of workers exposed to welding fumes.

[1] E. Clayton, K.K. Wooller, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 1075.

[2] J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, *Acceleration and Automation of Solid Sample Treatment*, Elsevier, Amsterdam, 2002.



Comunicación IV

**FAST FLOW INJECTION FLAME ATOMIC ABSORPTION  
DETERMINATION OF URINARY NICKEL IN WORKERS  
EXPOSED TO WELDING FUMES**

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

***Third International Symposium FESTEM (Federation of European  
Societies on Trace Elements and Minerals)***

Santiago de Compostela, 16-19/5/2007



IV







Revista de la  
Sociedad Española de  
Bioquímica Clínica  
y Patología Molecular

# QUIMICA CLINICA

2007; 26 (S-1) (S1-S62)  
(Special Supplement Symposium FESTEM)

THIRD INTERNATIONAL SYMPOSIUM  
FEDERATION OF EUROPEAN SOCIETIES ON  
TRACE ELEMENTS AND MINERALS  
**FESTEM**

16<sup>TH</sup> - 19<sup>TH</sup> MAY 2007  
SANTIAGO DE COMPOSTELA  
(SPAIN)

ABSTRACTS VOLUME

El contenido de esta revista se cita en:

CHEMICAL ABSTRACTS  
CURRENT ADVANCES IN CLINICAL  
CHEMISTRY  
EMBASE / EXCERPTA MEDICA  
ELSEVIER BIOBASE / CURRENT AWARENESS  
IN BIOLOGICAL SCIENCES  
PROQUEST INFORMATION AND LEARNING





P 021

# PERFORMANCE OF LABORATORY PARTICIPANTS IN EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SCHEMES FOR SERUM COPPER, ZINC AND SELENIUM

ARNAUD J, WEIKAMP C, WEBER JP, ANGERER J, MAIRIAUX E, PARSONS PJ, PATRIARCA M, TAYLOR A

Département de Biologie, CHU de Grenoble, France

The aims of the "Thematic network of organizers of external quality assessment / proficiency testing schemes related to occupational and environmental laboratory medicine" include the harmonization of procedures used to evaluate the performance of laboratories involved in the determination of trace elements in clinical biochemistry, through proficiency testing (ISO 13528).

The present communication is focussed on the determination of copper, zinc and selenium in human serum or plasma.

It was noted that the EQA/PTA schemes in the Network set quite different standards by which performance of participants is evaluated. To achieve consistency, objectively derived quality specifications have been defined which can be applied to calculations of Z-scores for performance monitoring. The quality specifications were calculated according to Frazer (Scand J Clin Lab Invest 1999; 59 : 487-490) using published data on intra- and inter-individual biological variation. They were then used in a collaborative project in which three samples of human serum were sent to the participants of all the schemes. The consensus quality specification limits were: 1) Copper  $\pm 0.84$   $\mu\text{mol/L}$  or  $\pm 12\%$ , whichever is the greater, 2) Selenium  $\pm 0.072$   $\mu\text{mol/L}$  or  $\pm 12\%$ , whichever is the greater and 3) Zinc  $\pm 1.20$   $\mu\text{mol/L}$  or  $\pm 15\%$ , whichever is the greater.

These consensus limits are generally less severe than the quality specification currently used by the different schemes. Using the consensus quality specification criteria and common samples, the percentages of unacceptable results reported by participants fluctuated between 7 and 30% depending on the element, the concentration and the scheme.

This work provides a foundation for further harmonisation of performance monitoring and collaboration among the schemes.

P 023

# PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION AND INDUCTIVELY COUPLED PLASMA - OPTICAL EMISSION SPECTROMETRY FOR MAJOR AND TRACE ELEMENTS DETERMINATION IN HUMAN SCALP HAIR

MOREDA PIÑEIRO J, ALONSO RODRÍGUEZ E, LÓPEZ MAHÍ A, MUNIATEGUI LORENZO S, PRADA RODRÍGUEZ D, MOREDA PIÑEIRO A, BERMEJO BARRERA P

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of A Coruña, Spain

An analytical method for the determination of major (Ca, K, Mg and Na) and trace elements (As, Cd, Co, Li, Ni and Sr) in human scalp hair has been developed. The proposed method includes a novel, simple, fast, high efficient and automated metal leaching procedure by pressurized liquid extraction (PLE) combined with a rapid and simultaneous detection system as inductively coupled plasma - optical emission spectrometry (ICP-OES). PLE is one of the most promising and recent sample preparation techniques that offers the advantages of reducing solvent consumption and allowing for automated sample handling. The operating parameters for PLE including solvent extraction concentration, extraction temperature, static time, extraction steps, pressure, mean particle size, diatomaceous earth (DE) mass/sample mass ratio and flush volume were studied using design of experiments (Plackett-Burman design PBD). Optimum conditions implies an acetic acid at 0.75 M as an extracting solution and powdered hair samples fully mixed with DE as a dispersing agent at a DE mass/sample mass ratio of 4. The extraction has been carried out at room temperature and at an extraction pressure of 1500 psi for 5 min in one extraction step. The flush volume was finally fixed at 60%. The PLE assisted multi-element leaching proposed is completed after 7 min (5 min of static time plus 1 min of purge time plus 1 min of end relief time). Under optimised conditions, the figures of merit, such as limits of detection and quantification, repeatability of the over-all procedure and accuracy were evaluated. The analysis of GBW-07601 (human hair) certified reference material has shown good accuracy for the target elements. The optimised method has been finally applied to several human scalp hair samples.

P 022

# RAPID AND RELIABLE ASSAY FOR HUMAN ERYTHROCYTE FERRITIN.

OTERO-MARTÍNEZ S, GARCÍA-PELLITERO A, VIDAL-RÍOS P

Central Laboratory, University Hospital of Santiago. Santiago de Compostela, Spain

Iron is one of the trace elements more studied in the practice clinic for his relation with different diseases. An array of test are routinely available with which iron status can be assessed. However, in terms of the assessment of store status the serum ferritin concentration is the only readily and widely applicable measurement. As iron stores increase, serum ferritin concentration also increases and when stores are exhausted the serum ferritin fall. Additional factors may also confound the interpretation of serum ferritin data. Infection, inflammation and neoplasia may raise the serum ferritin concentration disproportionately to the iron storage. An alternative in these cases is to use erythrocyte ferritin levels as an index of intracellular iron stores. The aim of this study was to describe a simple and reliable method for the red cell ferritin determination. These measurements have some problems: We must avoid contamination by leukocytes, for which the ferritin content can be as much as 1000-fold that of a red cell. For removal leukocytes different methods are proposed in the bibliography: Filtration in a column composed by cellulose and microcrystalline cellulose, centrifugation in gradient of density of Percoll or repeated washes with saline whey. Other problem is the red cell dilution in the hemolizate. The dilution takes the determination of ferritin to the low part of the standard curve. We also must avoid the contamination of the hemolizate with serum ferritin. The method most widely used is the recommended by the French Society of Clinical Biology (SFBC): After the centrifugation of 5 mL of whole blood, the plasma and buffy coat were removed. The erythrocytes were washed five times by resuspension in saline solution (0.9% NaCl) and centrifuged, after each wash the same procedure was followed. The erythrocytes were haemolysed by diluting in 2 volumes of distilled water and the stroma removed by centrifugation at 10.000 g. The erythrocyte ferritin level was assayed using a micro particle enzyme immunoassay (MEIA) Ferritin kit and a AXSYM analyzer. Hematological values were also measured in the whole blood and hemolizate using and ADVIA 120 counter (Bayer) Erythrocyte ferritin concentration was calculated using the equation: ERY-FER= ERY FER in hemolizate\*Hb in whole blood/ (RBC in whole blood\*Hb in hemolizate) This concentration is measured as attog/cell (10 e-18 gram/cell)

P 024

# FAST FLOW INJECTION FLAME ATOMIC ABSORPTION DETERMINATION OF URINARY NICKEL IN WORKERSEXPOSED TO WELDING FUMES.

CESPÓN RM, YEBRA MC

Department of Analytical Chemistry, Nutrition & Bromatology. Faculty of Chemistry. University of Santiago de Compostela, Spain

The determination of a toxic metal as nickel in urine is an important clinical screening procedure. Urine is easily sampled and its determination is a suitable test for workers exposed to Ni compounds [1]. Flame atomic absorption spectrometry (FAAS) still continues to be one of the most attractive approaches for trace metals analysis in most laboratories due to its relatively low operational costs, easy operation, and high sample throughput. However, direct FAAS determination of trace amounts of nickel in urine samples is usually difficult owing to its insufficient detection power. Thus, continuous preconcentration procedures involving a flow injection (FI) manifold with a minicolumn containing a chelating resin have been shown to be efficient and effective in enhancing the sensitivity of FAAS [2]. In these procedures, urine pretreatment is mandatory previous nickel preconcentration to destroy the organic matter and decompose organic nickel compounds. In this sense, microwave digestion is particularly suited for preparation of urine samples. Although recently, a new, safe and fast sample pretreatment was proposed. This involves ultrasound-assisted oxidation with oxidant reagents [3].

In this work, we explore the benefits of ultrasounds for urine sample preparation in an on-line mode. The oxidation unit is connected to a FI preconcentration manifold, which comprises of a minicolumn filled with a chelating resin (Chelate P, with aminomethylphosphoric acid groups). Thus, nickel is on-line eluted and determined by FAAS. The method was applied to the determination of Ni in urine samples of workers exposed to welding fumes to evaluate the degree of exposure in their working environments.

1. Iarmarcovai G, Sari-Minodier I, Chaspoul F, Botta C, De Meo M, Orsiere T, Berge-LeFranc JL, Gallice P, Botta A. *Mutagenesis* 2005;20:425-32.
2. Fang Z. *Flow Injection Separation and Preconcentration*. VCH, Weinheim, 1993.
3. Capelo JL, Madoño C, Mota AM. *J Anal At Spectrom* 2004;19:414-16.



Comunicación V

**DYNAMIC ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION OF  
MANGANESE FROM HAIR SAMPLES FROM WORKERS  
EXPOSED TO WELDING FUMES**

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

***Third International Symposium FESTEM (Federation of European  
Societies on Trace Elements and Minerals)***

Santiago de Compostela, 16-19/5/2007









Revista de la  
Sociedad Española de  
Bioquímica Clínica  
y Patología Molecular

# QUIMICA CLINICA

2007; 26 (S-1) (S1-S62)  
(Special Supplement Symposium FESTEM)

THIRD INTERNATIONAL SYMPOSIUM  
FEDERATION OF EUROPEAN SOCIETIES ON  
TRACE ELEMENTS AND MINERALS  
**FESTEM**

16<sup>TH</sup> - 19<sup>TH</sup> MAY 2007  
SANTIAGO DE COMPOSTELA  
(SPAIN)

ABSTRACTS VOLUME

El contenido de esta revista se cita en:

CHEMICAL ABSTRACTS  
CURRENT ADVANCES IN CLINICAL  
CHEMISTRY  
EMBASE / EXCERPTA MEDICA  
ELSEVIER BIOBASE / CURRENT AWARENESS  
IN BIOLOGICAL SCIENCES  
PROQUEST INFORMATION AND LEARNING





P 025

**DYNAMIC ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION OF MANGANESE FROM HAIR SAMPLES FROM WORKERS EXPOSED TO WELDING FUMES**

CESPÓN RM, YEBRA MC

Department of Analytical Chemistry, Nutrition &amp; Bromatology. Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela. Spain

Welding is the most common source of occupational exposure of manganese because it is an essential component of steel and so its compounds are inevitable components of fume emitted from steel welding processes. Manganese in welding fume has been nominated as a neurotoxin [1]. The determination of manganese in hair is considered to be one of the best methods for monitoring subjects who potentially are at risk of overexposure to manganese with consequent intoxication. As hair is a solid material, its dissolution is usually necessary in order to determine trace metals by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). Sample pre-treatment proposed to bring hair samples into solution involve dry ashing and several off-line digestions [2]. Nevertheless, these procedures are time consuming and tedious, and may introduce problems, such as sample contamination or analyte losses. Furthermore, acid digestions are unsafe procedures because the required large volume of concentrated strong oxidising mineral acids produce highly carcinogenic nitrous fumes. In contraposition, it has been proven that ultrasonic assisted extraction with diluted acids is an excellent and effective way of extracting a number of analytes from different types of samples, above all, performed in a dynamic mode coupled to a flow injection (FI) system [3]. The focus of the current work is the application of a dynamic ultrasound-assisted extraction procedure to extract manganese from hair samples of workers exposed to welding fumes and their determination by FAAS using a FI manifold. First, a Plackett-Burman design was used to establish the significant variables affecting the dynamic ultrasound-assisted extraction procedure. Then, a central composite design was performed to obtain the optimum conditions. The variables under study were: sonication time, nature and concentration of the acid solution used as extraction solution, ultrasonic water-bath temperature, flow-rate of the continuous manifold and extraction solution volume. The proposed method was applied with satisfactory results to the determination of Mn in hair samples of workers exposed to welding fumes.

1. McMillan G. *Toxicol Rev* 2005;24:237-57.2. Afridi HI, Kazi TG, Jamali MK, Kazi GH, Arain MB, Jalbani N, Shar GQ. *Spectrosc Lett* 2006;39:203-214.3. Luque de Castro MD, Priego Capote F. *Analytical Applications of Ultrasound*. Elsevier, Amsterdam, 2006.**Session 2: Trace Elements in Molecular Biology**

P 026

**ANTIOXIDANT GENE EXPRESSION ASSOCIATED WITH CHROMIUM HISTIDINATE IN HACAT HUMAN KERATINOCYTES WITH H2O2 MEDIATED STRESS**ISABELLE HININGER<sup>A</sup>, FLORENCE HAZANE<sup>A</sup>, RACHIDA BENARABA<sup>A</sup>, KITA VALENTI<sup>B</sup>, ALAIN FAVIER<sup>B</sup>, ANNE-MARIE ROUSSEL<sup>A</sup>, RICHARD A. ANDERSON<sup>C</sup><sup>A</sup>Laboratoire NVMC (Nutrition, Vieillesse, Maladies Cardiovasculaires), Faculté de Pharmacie, Université J. Fourier Université, La Tronche, France<sup>B</sup>Département de Biologie Intégrée, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France<sup>C</sup>USDA, ARS, BHNRC, NRFL; Bldg. 7C, Rm. 222, BARC-East; Beltsville, MD 20705-2350

Chromium (Cr) is present in our environment in mainly trivalent and hexavalent forms. While the toxicity of hexavalent chromium is well established, it appears that trivalent Cr is an essential nutrient with low toxicity. Several studies have demonstrated the beneficial effects of supplemental trivalent Cr in subjects with reduced insulin sensitivity with no signs of toxicity. However, recent studies questioned the safety of supplemental trivalent Cr complexes. The role and protective effects of trivalent chromium histidinate (Cr(III)His) against hydrogen peroxide induced oxidative stress was examined using antioxidant and cDNA measurements. HaCaT keratinocytes were submitted to 50  $\mu$ M Cr(III)His with and without  $H_2O_2$  treatment (50  $\mu$ M). Total RNA was isolated immediately after and 6h after stress. Gene modulation was studied as a function of  $H_2O_2$  and/or Cr(III)His treatments by multiple analysis (n=4). In Cr(III)His treated cells, transcripts related to antioxidant family were upregulated (AOE372, GSS, SCH1) as POLD2 and FOSB. When cells were preincubated with the Cr(III)His before  $H_2O_2$ , we observed an increased expression in genes implicated in oxidative repair (POLD2) and antioxidant defense (GSS) whereas SOD2 transcript was down regulated. These results could be related to biochemical oxidative stress parameters showing that  $H_2O_2$  generates oxidative stress by depletion of thiol groups and induction of TBARS. These deleterious effects were prevented by Cr(III)His. In summary these data demonstrate that Cr(III)His prevents peroxide induced oxidation with no signs of toxicity.

P 027

**MANGANESE (II) INDUCED APOPTOSIS IN HUH7 CELLS IS CORRELATED WITH THE MITOCHONDRIAL REDUCED GLUTATHIONE LEVEL**

MUNTEANU MC, HUCULECI R, TESIO C, COSTACHE M, DINISCHIOTU A

University of Bucharest, Department of Biochemistry, Bucharest, Romania

Manganese (II) is an essential nutrient that has prooxidant activity at an excessive level. It is able to counteract oxidative products and modulate apoptosis depending on the cell type and concentration used. By ingestion, this metal can be concentrated in liver cells generating hepatic disorders. The 5mM Mn(II) treated Huh7 cells released cytochrome C from mitochondria in cytosol starting with 4 hours of exposure. The cellular content of GSH is highly increased between two (368%) and six (251%) hours of exposure. In the same period of time, the mitochondrial GSH level is slightly decreased; with 4.2% and 9.6% after two respectively six hours. The internucleosomal DNA fragmentation starting with 24 hours of treatment was noticed. Our results suggest that cytochrome C releasing in cytosol could be a consequence of the decreasing of the mitochondrial GSH level in the Mn(II) induced apoptosis in Huh7 cells.



Comunicación VI

**FLOW INJECTION ON-LINE DILUTION FOR ZINC  
DETERMINATION IN URINE FROM WORKERS EXPOSED TO  
WELDING FUMES BY FAAS  
(enviado resumen)**

R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

***6th International Conference on Occupational Risk Prevention***

La Coruña, 14-16/5/2008







# **FLOW INJECTION ON-LINE DILUTION FOR ZINC DETERMINATION IN URINE FROM WORKERS EXPOSED TO WELDING FUMES BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY**

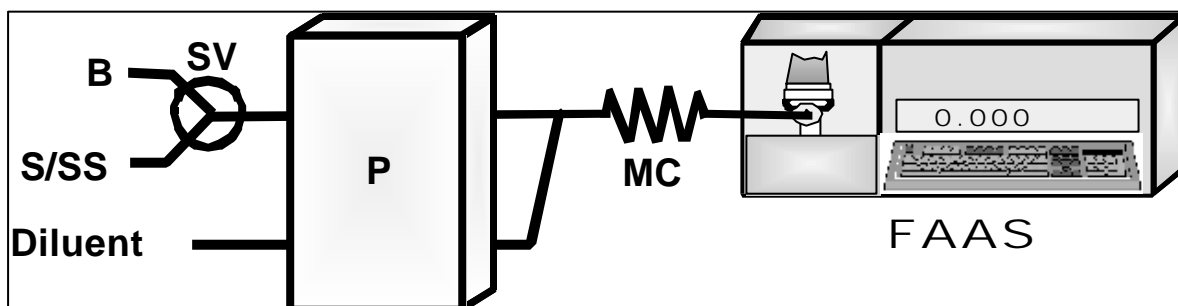
R. M. Cespón-Romero, M. C. Yebra-Biurrun

Department of Analytical Chemistry, Nutrition & Bromatology. Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela. 15782-Santiago de Compostela, Spain. email: [gncayebi@usc.es](mailto:gncayebi@usc.es)

Zinc is an important element both biologically and environmentally. It plays a specific role in a variety of biological reactions in all living organisms. More than one hundred specific enzymes require zinc for their catalytic function. Because of the multiple biological functions of zinc and its ubiquitous distribution in human tissues, there is broad range of physiological signs of zinc deficiency, viz. diarrhea, respiratory infections, susceptibility to malaria, etc. However, a zinc excess can interfere with iron and copper absorption. Usually, toxicological risks in the workplace include exposure to freshly generated zinc oxide fumes from welding on galvanized iron/steel. This metal exposure can lead to metal fume fever causing: sweet metallic taste, dry cough, shortness of breath, myalgias, fever, chills, leucocytosis; beginning 4 to 12 hours after exposure [1-3].

In this work, a simple automatic method is described for the determination of zinc in human urine by flow-injection flame atomic absorption spectrometry (FI-FAAS) after on-line dilution of samples with a significant reduction of sample consumption per analysis (<0.5 mL including the dead volume of the system). The principal parts of this flow system (Figure 1) are: one propulsion device (peristaltic pump, P) to introduce into the flow system the

diluent solution (ultrapure water) and the urine sample, standard or the blank solutions, a switching valve (SV) which allowed the selection of the sample, standard or blank solution channel, and a mixing coil (MC) to homogenize the two streams that converged (sample, standards or blank solution stream and the diluent stream). Matrix effects were minimized by employing a dilution factor of 10.0. The precision tested by repeated analysis of real urine samples was less than 3% and the detection limit ( $3\sigma$ ) was of 38.8  $\mu\text{g/L}$ . To test the accuracy of the proposed procedure, recovery tests were performed, obtaining a mean recovery of added zinc of  $98.7\pm1.3\%$ . The method was applied to the determination of zinc in urine samples of workers exposed to welding fumes to evaluate the degree of exposure in their working environments.



**Figure 1.** Continuous manifold for Zn determination in urine samples. B: blank; FAAS: flame atomic absorption spectrometer; MC: mixing coil; P: peristaltic pump; S/SS: sample or standard solution; SV: switching valve

- [1] C. Horng, *Analyst* (1996) **121**, 1511.
- [2] A. Townsend, K.A. Miller, S. McLean, S. Aldous,. *J. Anal. At. Spectrom.* (1998) **13**, 1213.
- [3] T. Miyamoto, E. Kobayashi, Y. Suwazono, M. Uetani, M. Nishijo, K. Miura, H. Nakagawa, K. Nogawa, *Archives of Environmental & Occupational Health* (2006) **61**, 215.

**E**n este trabajo de investigación se han optimizado y desarrollado métodos analíticos automáticos basados en sistemas de análisis por inyección en flujo (FIA) que han permitido la determinación de metales por espectroscopía de absorción atómica en muestras de aire procedentes del medio ambiente laboral y en muestras biológicas (pelo y orina) de trabajadores expuestos a riesgo químico por humos metálicos.

Los objetivos planteados han sido simplificar, miniaturizar y automatizar todas las etapas del proceso analítico mediante el empleo de diferentes estrategias. Para alcanzar estos objetivos se han desarrollado y puesto a punto nuevos dispositivos de extracción continua acoplados en línea a un espectrofotómetro de absorción atómica con llama que permiten la introducción directa y procesado de los filtros de captación de aire y de las muestras de pelo. Por otro lado, para la determinación de metales en orina ha sido necesario acoplar un sistema de preconcentración en línea después de realizar la digestión de la muestra en el sistema FIA. Además, se propone un sistema continuo de dilución en línea de la muestra de orina para la determinación de cinc. En definitiva, se ha tratado de desarrollar metodologías analíticas innovadoras, automáticas, rápidas y sencillas que permiten resolver problemáticas analíticas reales relativas a la higiene industrial y más concretamente a la higiene analítica.

